



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Determinación de la composición química mediante cromatografía de gases/ espectrometría de masas (CG/EM), actividad antimicrobiana y antioxidante de los aceites esenciales de las especies *Croton adipatus*, *Croton thurifer* y *Croton collinus*

TESIS

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

AUTOR

Juana Liz Leslie CUCHO MEDRANO

Sammy Wesley MENDOZA BEINGOLEA

Lima, Perú

2018



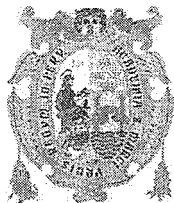
Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Cucho J, Mendoza S. Determinación de la composición química mediante cromatografía de gases/ espectrometría de masas (CG/EM), actividad antimicrobiana y antioxidante de los aceites esenciales de las especies *Croton adipatus*, *Croton thurifer* y *Croton collinus* [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2018.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Decanato



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

15-18/N
111-R

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

"Determinación de la composición química mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM), actividad antimicrobiana y antioxidante de los aceites esenciales de las especies *Croton adipatus*, *Croton thurifer* y *Croton collinus*"

Que presentan los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

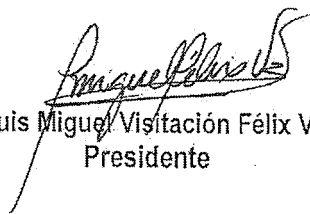
**JUANA LIZ LESLIE CUCHO MEDRANO Y
SAMMY WESLEY MENDOZA BEINGOLEA**


Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:


----- Dieciocho (18) -----

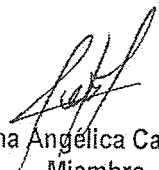
en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 17 de mayo de 2018.


Dr. Luis Miguel Visitación Félix Veliz
Presidente


Dra. Yacira Fernández Jerí
Miembro


Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz
Miembro


Mg. Norma Angélica Carlos Casas
Miembro

"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"



A mi madre **Antonina**, por su apoyo incondicional e infinito amor, por sus consejos así como su motivación constante y enseñarme a luchar por mis sueños,

En memoria de mi abuelita **Estela**, por su infinito amor y bondad, por su enseñanzas y apoyo incondicional

Cucho Medrano, Juana Liz Leslie

A mi madre **Georgina**, por ser la guía que ilumina mi camino, por sus consejos, paciencia y eterno amor. A ella toda mi consideración y respetos.

Mendoza Beingolea, Sammy Wesley

Agradecimientos

A nuestra alma mater la Decana de América, Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a la Facultad de Farmacia y Bioquímica por la formación durante nuestra carrera profesional.

A nuestro asesor de tesis, **Mg. César Máximo Fuertes Ruitón** por compartir su amplio conocimiento y experiencia durante el desarrollo de la tesis.

A nuestra co-asesora de tesis, **Dra. María Elena Salazar Salvatierra** por su amplio conocimiento y experiencia en el desarrollo de la tesis y su valioso e incondicional apoyo.

En memoria a la **Q.F Bertha Jurado** por su gran calidad humana y su apoyo durante la extracción de las muestras.

Al **Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz** por su apoyo brindado durante la ejecución de la tesis.

Al **Blgo. José R. Campos De la Cruz** por su disposición de apoyo y amistad.

Al **Vicerrectorado de Investigación y Postgrado** por el apoyo financiero para la realización del presente trabajo.

A los miembros del Jurado examinador y calificador por los aportes: Dr. Luis Miguel Visitación Félix Veliz, Dra. Yadira Fernández Jerí, Mg. Julio Reynaldo Ruiz Quiroz y Mg. Norma Angélica Carlos Casas.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN

SUMMARY

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general.....	3
1.2. Objetivos específicos	3
1.3. Hipótesis	3
II. GENERALIDADES.....	4
2.1. Antecedentes	4
2.2. Familia Euphorbiaceae	10
2.3. Género Croton	11
2.4. Aspectos botánicos de las especies en estudio.....	12
2.4.1. <i>Croton adipatus</i> Kunth	12
2.4.2. <i>Croton thurifer</i> Kunth.....	14
2.4.3. <i>Croton collinus</i> Kunth.....	16
2.5. Aceites esenciales	18
2.5.1. Métodos de extracción.....	18
2.5.2. Propiedades de los aceites esenciales	20
2.5.3. Características fisicoquímicas	20
2.5.4. Composición química.....	21
2.6. Métodos para evaluar la composición química de los aceites esenciales...	24
2.7. Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana	26
2.7.1. Difusión en agar.....	26
2.7.2. Dilución en caldo.....	26
2.7.3. Dilución en agar	27
2.8. Actividad antioxidante	27
2.8.1. Radicales libres (RL).....	27

2.8.2. Estrés oxidativo.....	28
2.8.3. Antioxidantes	29
2.8.4. Métodos para evaluar la actividad antioxidante	30
III. PARTE EXPERIMENTAL.....	31
3.1. Materiales y métodos	31
3.1.1. Materiales, reactivos y equipos.....	31
3.1.2. Entidades donde se desarrolló la investigación	33
3.1.3. Metodología	34
IV. RESULTADOS.....	50
4.1. Análisis preliminar de los aceites esenciales	50
4.2. Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM) de aceites esenciales	51
4.2.1. Cromatografía de gases/espectrometría de masas de <i>Croton adipatus</i> Kunth	51
4.2.2. Cromatografía de gases/espectrometría de masas de <i>Croton thurifer</i> Kunth	55
4.2.3. Cromatografía de gases/espectrometría de masas de <i>Croton collinus</i> Kunth	58
4.3. Actividad antimicrobiana	62
4.3.1. Método de difusión en agar	62
4.3.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de microdilución colorimétrica en microplaca	69
4.4. Actividad antioxidante por el método DPPH (1,1-difenil-2-2-picril-hidrazilo) 73	
V. DISCUSIÓN.....	78
VI. CONCLUSIONES	87
VII. RECOMENDACIONES.....	88
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
IX. ANEXOS	101

Abreviaturas

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CG/EM: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

CCF: Cromatografía en capa fina

CG: Cromatografía de gases

CLAR: Cromatografía líquida de alta resolución

IR: Espectrometría Infrarroja

EM: Espectrometría de Masas

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

CLAR/EM: Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

RL: Radical libre

ERO: Especies reactivas de oxígeno

ARN: Ácido ribonucleico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

%RAE: Porcentaje de rendimiento del aceite esencial

DMSO: Dimetil sulfóxido

DPPH: Radical 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo

IC₅₀: Concentración efectiva media

Lista de Figuras

Figura 1. <i>Croton adipatus</i> Kunth.....	13
Figura 2. <i>Croton thurifer</i> Kunth	15
Figura 3. <i>Croton collinus</i> Kunth	17
Figura 4. Clasificación y estructura química de algunos monoterpenos	22
Figura 5. Clasificación y estructura química de algunos sesquiterpenos.	23
Figura 6. Reacción de oxidación de Resazurina.	46
Figura 7. Reacción de DPPH.....	47
Figura 8. Cromatograma CG/EM del aceite esencial de <i>Croton adipatus</i> Kunth..	53
Figura 9. Espectro de la estructura β -mirceno del aceite esencial de <i>Croton adipatus</i> Kunth.....	53
Figura 10. Espectro de la estructura α -thuyeno del aceite esencial de <i>Croton adipatus</i> Kunth.	54
Figura 11. Espectro de la estructura D-limoneno del aceite esencial de <i>Croton adipatus</i> Kunth.	54
Figura 12. Cromatograma CG/EM del aceite esencial de <i>Croton thurifer</i> Kunth. .	56
Figura 13. Espectro de compuesto desconocido ($C_{10}H_{16}$) del aceite esencial de <i>Croton thurifer</i> Kunth.	57
Figura 14. Espectro de compuesto desconocido ($C_{15}H_{26}O$) del aceite esencial de <i>Croton thurifer</i> Kunth.	57
Figura 15. Espectro de la estructura β -elemeno del aceite esencial de <i>Croton thurifer</i> Kunth.....	58
Figura 16. Cromatograma CG/EM del aceite esencial de <i>Croton collinus</i> Kunth..	60
Figura 17. Espectro de la estructura β -cariofileno del aceite esencial de <i>Croton collinus</i> Kunth.	60

Figura 18. Espectro de la estructura D-limoneno del aceite esencial de <i>Croton collinus</i> Kunth.	61
Figura 19. Espectro de la estructura β -thuyeno del aceite esencial de <i>Croton collinus</i> Kunth.	61
Figura 20. Gráfico comparativo de los resultados de la determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales a tres concentraciones (10%, 50%, 95%) por el Método de Difusión en Agar.	65
Figura 21. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Croton adipatus</i> Kunth en las diferentes concentraciones 10%, 50% y 95% por el método de difusión en agar contra los microorganismos mencionados en la leyenda.	66
Figura 22. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Croton thurifer</i> Kunth en las diferentes concentraciones 10%, 50% y 95% por el método de difusión en agar contra los microorganismos mencionados en la leyenda.	67
Figura 23. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de <i>Croton collinus</i> Kunth en las diferentes concentraciones 10%, 50% y 95% por el método de difusión en agar contra los microorganismos mencionados en la leyenda.	68
Figura 24. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de <i>Croton adipatus</i> Kunth contra los microorganismos.	71
Figura 25. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de <i>Croton thurifer</i> Kunth contra los microorganismos.	71
Figura 26. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de <i>Croton collinus</i> Kunth contra los microorganismos.	71
Figura 27. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del estándar Ciprofloxacino contra cuatro microorganismos.	72
Figura 28. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del estándar Ketoconazol contra <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	72
Figura 29. Correlación entre las concentraciones del aceite esencial de <i>Croton adipatus</i> Kunth vs el porcentaje de inhibición del radical DPPH.	73

Figura 30. Correlación entre las concentraciones del aceite esencial de <i>Croton thurifer</i> Kunth vs el porcentaje de inhibición del radical DPPH.....	74
Figura 31. Correlación entre las concentraciones del aceite esencial de <i>Croton collinus</i> Kunth vs el porcentaje de inhibición del radical DPPH.....	75
Figura 32. Correlación entre las concentraciones del estándar Vitamina C vs el porcentaje de inhibición del radical DPPH.	76
Figura 33. Comparativo IC ₅₀ de los tres aceites esenciales.	77

Lista de Tablas

Tabla 1. Ejemplos de monoterpenos de acuerdo a sus funciones y estructura.	22
Tabla 2. Ejemplos de sesquiterpenos de acuerdo a sus grupos funcionales.....	23
Tabla 3. Ventajas y desventajas de diferentes técnicas analíticas para el análisis de composición química de los aceites esenciales.	25
Tabla 4. Fuentes de radicales libres.	28
Tabla 5. Clasificación de antioxidantes de acuerdo a su origen.	29
Tabla 6. Clasificación de métodos para evaluar la actividad antioxidante.	30
Tabla 7. Dilución de los aceites esenciales.	43
Tabla 8. Dilución del Ciprofloxacino.....	44
Tabla 9. Dilución del Ketoconazol.....	45
Tabla 10. Interpretación de resultados para Concentración Mínima Inhibitoria	47
Tabla 11. Preparación de las muestras para la prueba de Captación del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH).	48
Tabla 12. Preparación de la Vitamina C para la prueba de Captación del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH).	49
Tabla 13. Análisis de las características organolépticas de los aceites esenciales en estudio.....	50
Tabla 14. Propiedades fisicoquímicas y rendimiento de los aceites esenciales en estudio.....	50
Tabla 15. Composición química del aceite esencial de <i>Croton adipatus</i> Kunth determinado por Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas.	51
Tabla 16. Composición química del aceite esencial de <i>Croton thurifer</i> Kunth determinado por Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas.	55
Tabla 17. Composición química del aceite esencial <i>Croton collinus</i> Kunth determinado por Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas.	59

Tabla 18. Actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar del aceite esencial de <i>Croton adipatus</i> Kunth.	62
Tabla 19. Actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar del aceite esencial de <i>Croton thurifer</i> Kunth.	62
Tabla 20. Actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar del aceite esencial de <i>Croton collinus</i> Kunth.....	63
Tabla 21. Actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar de los estándares Ciprofloxacino y Ketoconazol.	63
Tabla 22. Cuadro comparativo de los resultados de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y los estándares mediante el método de difusión en agar.	64
Tabla 23. Valores de la Concentración Mínima Inhibitoria de los tres aceites esenciales contra cinco microorganismos.	69
Tabla 24. Valores de la Concentración Mínima Inhibitoria de los controles Ciprofloxacino y Ketoconazol contra cinco microorganismos.....	69
Tabla 25. Cuadro comparativo de resultados obtenidos de la Concentración Mínima Inhibitoria de los tres aceites esenciales y los estándares mediante el método de microdilución colorimétrica.	70
Tabla 26. Porcentaje de inhibición de radicales libres por el método DPPH para el aceite esencial de <i>Croton adipatus</i> Kunth.	73
Tabla 27. Porcentaje de inhibición de radicales libres por el método DPPH para el aceite esencial de <i>Croton thurifer</i> Kunth.	74
Tabla 28. Porcentaje de inhibición de radicales libres por el método DPPH para el aceite esencial de <i>Croton collinus</i> Kunth.....	75
Tabla 29. Porcentaje de inhibición de radicales libres por el método DPPH para el estándar Vitamina C.....	76
Tabla 30. Cuadro comparativo de los tres aceites esenciales y el estándar Vitamina C.....	77

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar la composición química, actividad antimicrobiana y antioxidante de los aceites esenciales de *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth. Los aceites esenciales fueron extraídos de las hojas de las especies seleccionadas por hidrodestilación y las composiciones químicas fueron determinadas por Cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas (CG/EM). Las actividades antimicrobianas fueron evaluadas usando el método de difusión en agar y microdilución colorimétrica contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Candida albicans* ATCC 10231. La actividad antioxidante se determinó mediante el método de captación de radical libre (DPPH). El aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth mostró un mayor número de componentes (46), seguido por *Croton collinus* Kunth (38) y *Croton thurifer* Kunth (35). Los principales componentes encontrados para *Croton adipatus* Kunth fueron β -mirceno (18,34%), α -thuyeno (12,69%), D-limoneno (10,94%), α -felandreno (8,19%) y β -elemeno (6,47%). Mientras que para el aceite esencial de *Croton collinus* Kunth fueron β -cariofileno (44,7%), D-limoneno (8,73%), β -thuyeno (6,96%), β -mirceno (6,79%) y β -elemeno (6,7%). Y para *Croton thurifer* Kunth fueron los componentes desconocidos ($C_{10}H_{16}$: 22,38%), ($C_{15}H_{26}O$: 21,8%), β -elemeno (11,87%) y germacreno D (10,22%). El aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth presentó actividad antimicrobiana moderada frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (0,31 μ L/mL) y actividad débil frente a *Candida albicans* ATCC 10231 (0,63 μ L/mL); para *Croton thurifer* Kunth actividad moderada frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (0,31 μ L/mL) y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (0,16 μ L/mL); y finalmente para *Croton collinus* Kunth buena actividad frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (0,08 μ L/mL) y actividad débil frente a *Candida albicans* ATCC 10231 (1,25 μ L/mL). Los aceites esenciales de *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth no presentaron actividad antioxidante para el método DPPH.

Palabras clave: *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth, *Croton collinus* Kunth, aceite esencial, antimicrobiana, composición química, antioxidante.

SUMMARY

The aim of the present study was to evaluate the chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of essential oils from *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth. Essential oils were extracted from the leaves of selected plants species by hydro-distillation and the chemical compositions were determined by Gas chromatography/Mass spectrometry (GC/MS). Antimicrobial activities were assessed using agar diffusion and micro-dilution colorimetric broth against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 and *Candida albicans* ATCC 10231. The antioxidant activity by the method of capturing free radical (DPPH). The essential oil from *Croton adipatus* Kunth showed a greater number of components (46), followed by *Croton collinus* Kunth (38) and *Croton thurifer* Kunth (35). The main compounds found for *Croton adipatus* Kunth were β -myrcene (18,34%), α -thuyene (12,69%), D-limonene (10,94%), α -phellandrene (8,19%) and β -elemene (6,47%). While for the essential oil of *Croton collinus* Kunth were β -caryophyllene (44,7%), D-limonene (8,73%), β -thuyene (6,96%), β -myrcene (6,79%) and β -elemene (6,7%). And for *Croton thurifer* Kunth were unknown component ($C_{10}H_{16}$: 22,38%), ($C_{15}H_{26}O$: 21,8%), β -elemene (11,87%) and germacrene D (10,22%). Essential oils of *Croton adipatus* Kunth showed moderate antimicrobial activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (0,31 μ L/mL) and weak activity against *Candida albicans* ATCC 10231 (0,63 μ L/mL); for *Croton thurifer* Kunth moderate activity against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (0,31 μ L/mL) and *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (0,16 μ L/mL); and finally for *Croton collinus* Kunth good activity against *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (0,08 μ L/mL) and weak activity against *Candida albicans* ATCC 10231 (1,25 μ L/mL). Essential oils *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth did not show antioxidant activity by the method DPPH.

Keywords: *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth, essential oil, antimicrobial, chemical composition, antioxidant.

I. INTRODUCCIÓN

“La medicina tradicional es la suma total de los conocimientos, habilidades y prácticas basadas en teorías, creencias y experiencias indígenas de distintas culturas, ya sean explicables o no, utilizados en el mantenimiento de la salud, así como en la prevención, el diagnóstico, la mejora o tratamiento de la enfermedad física y mental”¹.

El Perú es un país megadiverso debido a su localización geográfica; la flora peruana comprende alrededor de 25 000 especies que se distribuyen en los distintos pisos ecológicos. Una parte importante de la flora se desarrolla en los valles interandinos. En estas zonas, debido a la alta radiación solar y bajas temperaturas a las que están expuestas, las plantas han desarrollado defensas químicas específicas que les otorgan ventajas para la adaptación a su hábitat².

Dentro de estas plantas que son consideradas importantes para el desarrollo y aprovechamiento por sus distintas propiedades se encuentra la familia *Euphorbiaceae*. La cual es reconocida en el Perú por presentar 61 géneros y 323 especies. El género *Croton*, perteneciente a esta familia, es el más numeroso en especies endémicas³.

Las especies del género *Croton* son importantes a nivel local por sus diferentes propiedades medicinales, por ejemplo sus hojas son usadas como agentes cicatrizantes, hemostáticos, antidiarreicos, antiinflamatorios y antisépticos. Así como, para el tratamiento de cólicos uterinos, úlceras gastrointestinales, retención urinaria, baños vaginales preparto, hemorragias postparto, afecciones a la piel y para el control de fiebre asociada a males gastrointestinales⁴.

En las últimas décadas la aparición de la resistencia a los antimicrobianos ha generado alarmas en el sistema de salud, así como pérdidas económicas cuantiosas para la población. Varios factores han contribuido a la evolución de la resistencia a los antimicrobianos; que incluyen la adaptación microbiana a través de presiones selectivas, la automedicación en la comunidad y la escasez en el

desarrollo de nuevas moléculas⁵. Existen muchas terapias alternativas que incluyen el uso extendido de los aceites esenciales, los cuales son considerados metabolitos secundarios sintetizados en diferentes órganos de la planta como respuesta a las condiciones ambientales adversas, el ataque de plagas o herbívoros⁶.

Diversos estudios de investigación atribuyen a los aceites esenciales distintas propiedades medicinales tales como antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antidiabéticas, antitoxigénicas, antiparasitarias, insecticida, antimutagénica, antiprotozoarias, inmunomoduladora y antitumoral⁶⁻¹⁰.

Las especies *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth, son usadas por sus propiedades medicinales en las localidades de “El almendral” (Cajamarca) y “Jahuanga” (Amazonas); sin embargo, tales propiedades no han sido comprobadas científicamente. Otras especies estudiadas del mismo género en diversos países alrededor del mundo han reportado resultados satisfactorios e interesantes para la ciencia.

Al no existir estudios que validen las propiedades antibacterianas, antifúngicas y antioxidantes de los aceites esenciales de las especies investigadas. El presente estudio planteó el siguiente problema: ¿Los aceites esenciales de las especies *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth poseen actividad antimicrobiana y antioxidante?

Así mismo, los resultados de la presente investigación forjarán las bases para futuros estudios y aplicaciones de las mencionadas especies; estableciendo así nuestros recursos naturales como alternativa de salud frente a los antibióticos convencionales y a los antioxidantes artificiales.

1.1. Objetivo general

- Determinar la composición química, propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los aceites esenciales de *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth.

1.2. Objetivos específicos

- Determinar la composición química de los aceites esenciales de las especies *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM).
- Determinar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de las especies *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth.
- Determinar la actividad antioxidante de los aceites esenciales de las especies *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth.

1.3. Hipótesis

Los aceites esenciales de las especies *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth tienen actividad antimicrobiana y antioxidante.

II. GENERALIDADES

2.1. Antecedentes

Existen múltiples estudios de las distintas especies del género *Croton* alrededor del mundo los cuales atribuyen a sus aceites esenciales propiedades antimicrobianas y antioxidantes¹¹⁻²⁶.

Los aceites esenciales son mezclas líquidas volátiles muy complejas que pueden contener aproximadamente más de 60 componentes a concentraciones muy variadas que dependen de múltiples factores. Generalmente poseen dos o tres componentes en mayor proporción (20-70%). Generalmente, los componentes mayoritarios de los aceites esenciales son responsables de sus propiedades biológicas¹¹.

Peres y col., evaluaron la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico, fracciones metanólicas y compuestos aislados de la corteza del tallo de *Croton urucurana*, presentando mejor concentración mínima inhibitoria (CMI): 0,1 mg/mL contra *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhimurium* para la fracción aislada de ácido acetil aleuritólico¹².

De Almeida y col., estudiaron la composición química y la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de las hojas frescas y ramas de *Croton campestris* y obtuvieron como resultados del análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG/EM), los siguientes constituyentes en mayor concentración en el aceite esencial de las hojas frescas: β -cariofileno (17,0%) y biciclogermacreno (16,2%), y en las ramas: biciclogermacreno (11,3%) y espatulenol (14,7%). El aceite esencial de las hojas frescas presentó mayor actividad frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 12624 y *Escherichia coli* ATCC 25922 (512 μ g/mL), mientras que en las ramas el CMI mejor observado fue de 128 μ g/mL (contra *Staphylococcus aureus* ATCC 12624)¹³.

Yagi y col., evaluaron la composición química, actividad antibacteriana y actividad antioxidante de los aceites esenciales (tallos con hojas) de *Croton zambesicus*; por medio de CG/EM se determinó como grupos principales a los monoterpenos (68,84%), siendo los constituyentes en mayor proporción: 1,8-cineol (27,07%), cimeno (13,80%), α -terpineol (6,87%) y L-linalol (5,77%); así mismo, el aceite esencial presentó actividad antioxidante [EC50 ($4,20 \pm 0,19$) mg/mL]. Respecto a su evaluación antibacteriana se encontró actividad contra *Escherichia coli* ATCC 25922 (CMI: 16 μ g/mL), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (CMI: 250 μ g/mL), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (CMI: 16 μ g/mL), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CMI: 16 μ g/mL). Los resultados sugieren que el aceite esencial de esta planta podría ser utilizado como fuente de agentes antioxidantes y antibacterianos naturales¹⁴.

En otro estudio Alviano y col., demostraron que el aceite esencial de las hojas de *Croton cajucara* Benth inhibieron el crecimiento de microorganismos asociados con enfermedades de la cavidad oral: *Candida albicans* ATCC 51501 (CMI: 13 μ g/mL), *Lactobacillus casei* ATCC 4646 (CMI: 22,3 μ g/mL), *Staphylococcus aureus* ATCC 49456 (CMI: 33,4 μ g/mL), *Streptococcus sobrinus* ATCC 27609 (CMI: 13,8 μ g/mL), *Porphyromonas gingivalis* ATCC 43146 (CMI: 31,2 μ g/mL), y *Streptococcus mutans* ATCC 25175 (CMI: 40,1 μ g/mL). Así mismo, la fracción rica en linalol resultó ser más efectiva contra *Candida albicans* ATCC 51501 (CMI: 0,7 μ g/mL) respecto al aceite esencial completo y para el estándar de referencia clorhexidina (CMI: 50 μ g/mL). Además a partir de las evaluaciones se concluyó que el efecto antibacteriano no se debió a la presencia de linalol, sino a componentes todavía no elucidados¹⁵.

Donati y col., determinaron (CG/EM) como principales constituyentes de los aceites esenciales de *Croton zehntneri* al estragol (hoja: 89% p/p; corteza: 73% p/p) y trans-anetol (corteza: 15% p/p). Así mismo, se determinó la actividad antioxidante mediante el ensayo DPPH dando como

resultados IC_{50} de 36,38 mg/mL (hojas) y 27,40 mg/mL (tallos). El aceite esencial rico en estragol mostró actividad antifúngica apreciable frente a *Candida parapsilosis* ATCC 22019 (tallo: $19,3 \pm 0,3$ mm; hoja: $19,0 \pm 1,5$ mm), por el método de difusión en disco¹⁶.

En el estudio realizado por Voukeng y col., sobre la actividad antibacteriana contra los fenotipos multidrogo resistentes Gram positivas y Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Providencia stuartii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*), se determinó que el extracto de las hojas de *Croton macrostachys* mostró actividad en 83,33% (30 de 36) de los fenotipos estudiados con un rango de CMI de 128 μ g/mL y 1024 μ g/mL, demostrando que dicha especie contiene constituyentes con valiosas actividades antibacterianas frente a fenotipos resistentes a múltiples fármacos¹⁷.

En otro estudio realizado por Andrade y col., se determinó que el mayor componente aislado del aceite esencial de las hojas y tallos de *Croton zehntneri*, estragol (84,7%), presentó zonas importantes de inhibición (50 μ g/disco) contra Gram positivas, Gram negativas y hongos. Mostrando mayor actividad frente a *Microsporium sp.* ($15,76 \pm 0,21$ mm), *Bacillus megaterium* ($15,25 \pm 0,37$ mm), *Bacillus Subtilis* ($14,81 \pm 0,65$ mm), *Shigella paratyphi* ($14,53 \pm 0,37$ mm), etc. Además, por el método de microdilución, mostró un mejor CMI (38,52 μ g/mL) contra *Salmonella paratyphi*. La CMI de 58.75, 58.75, 61.54, 63.15, 63.43, 88.51, 131.2 y 145.0 μ g/mL también fueron encontradas contra *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Pityrosporum ovale*, *Bacillus megaterium*, *Shigella sonnei*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente¹⁸.

Melo y col., hallaron que el aceite esencial de las hojas de *Croton blanchetianus* Baill, posee propiedades antimicrobianas *in vitro*, mostrando actividad contra *Aeromonas hydrophila* (CMI: 20,0 μ L/mL), *Listeria*

monocytogenes ATCC 7644 (CMI: 1,25 μ L/mL) y *Salmonella Enteritidis* (CMI: 40,0 μ L/mL); no obstante, su eficacia fue reducida al evaluarse la preservación alimentaria de carne fresca (diez veces más que la concentración *in vitro*)¹⁹.

Moreno y col., por el método de CG/EM determinaron como principales constituyentes del aceite esencial de las hojas de *Croton heterocalyx* Baill: germacreno D (12,5%), biciclogermacreno (11,2%), δ -elemeno (9,2%), β -elemeno (8,2%), espatulenol (6,9%), linalool (5,4%) y 1,8-cineol (3,7%). Además, se encontró alta actividad frente a *Candida albicans* ATCC 10231 (100%), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (91,6%), *Aspergillus niger* ATCC 16404 (73,4%) para una concentración de 2,8 mg/mL; sin embargo, escasa actividad contra *Escherichia coli* ATCC 8739 (34,0%) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (21,5%)²⁰.

Vidal y col., determinaron como principales constituyentes del aceite esencial de las hojas de *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffman (CG/EM): espatulenol (22,46%) y 1,8-cineol (18,32%). La especie vegetal no presentó actividad antimicrobiana relevante; sin embargo, se obtuvo un efecto modulador elevado cuando el aceite esencial (16 μ g/mL) se asoció con β -lactámicos y aminoglucósidos frente *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; el aceite (8 μ g/mL) en la asociación con polienos antifúngicos presentó actividad contra la cepa de *Candida albicans*²¹.

De Heluani y col., determinaron por CG/EM los principales constituyentes del aceite esencial de las hojas de *Croton hieronymi* Griseb: alcanfor (13,9%) y borneol (5,9%); mientras que en la raíz: γ -asarona (25,7%), borneol (19,0%), (E)-asarona (11,4%) y alcanfor (11,1%). Además, se encontró que el aceite de raíz era activo contra *Escherichia coli* (CMI: 100 μ g/mL; crecimiento microorganismo: 0%) y *Candida albicans* (CMI: 100 μ g/mL; crecimiento microorganismo: 0%), moderadamente eficaz contra

Klebsiella pneumoniae [(CMI: 1000 µg/mL; crecimiento microorganismo: 0%), (CMI: 500 µg/mL; crecimiento microorganismo: 50%)] y mostró poca o ninguna actividad contra *Salmonella typhimurium* y *Streptococcus pyogenes*. Así mismo, el aceite de hoja fue activo contra *Klebsiella pneumoniae* (CMI: 100 µg/mL; crecimiento microorganismo: 0%) y moderadamente activo contra *Escherichia coli* (CMI: 500 µg/mL; crecimiento microorganismo: 20%)²².

En otro estudio realizado por Athikomkulehai y col., fueron determinados por CG/EM como mayores constituyentes del aceite esencial de la corteza de *Croton oblongifolius* Roxb: terpinen-4-ol (17,8%), α-guayeno (7,9%), α-bulneseno (7,2%), E-cariofileno (7,0%), mirceno (6,7%), (+)-ciclosativeno (5,1%), sabineno (4,8%). Así mismo, el aceite esencial mostró mayor actividad antibacteriana frente a *Propionibacterium acnés* ATCC 6919 (CMI: 125% v/v), siendo así una alternativa para tratar este tipo de afección²³.

Azevedo y col., por CG/EM determinaron como constituyente principal del aceite esencial de las hojas de *Croton cajucara* Benth al 7-hidroxicalameneno. Los aceites que contenían grandes cantidades de este compuesto fueron eficaces frente a *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis* ATCC 27294, *Mucor circinelloides* y *Rhizopus oryzae*. Además, el aceite esencial rico en 7-hidroxicalameneno presentó potente actividad antioxidante menor a 63,59 µg/mL²⁴.

Peixoto y col., determinaron por CG/EM que los aceites esenciales de las hojas y tallos de *Croton pullei* estaban compuestos principalmente por terpenos, siendo el linalol el de mayor porcentaje con concentraciones de 24,90% y 39,72%, respectivamente; así mismo, su extracto mostró actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistente a estreptomicina y dihiestreptomicina²⁵.

Fatiany y col., evaluaron mediante cromatografía de gases/detector de ionización de llama y cromatografía de gases/espectrometría de masas los principales constituyentes de los aceites esenciales de las hojas de *Croton greveanus*, *Croton borarium* y *Croton geayi*: 1, 8 cineol (40,40%) y linalol (23,81%); β -felandreno (39,72%), α -terpineol (25,12%) y canfeno (13,74%); β -pineno (28,74%) y limoneno (22,92%), respectivamente. Los aceites mostraron actividad CMB/CMI ≤ 4 μ L/mL contra las bacterias *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Enterobacter cloacae* ATCC 13047. También el aceite de *Croton borarium* mostró más actividad comparada con el cloranfenicol²⁶.

Respecto a los estudios realizados en el Perú en el género *Croton* se han reportado propiedades antibacterianas, leishmanicidas, antioxidantes y cicatrizantes²⁷⁻³⁰.

En el estudio realizado por Fuertes y col., se determinó por espectrometría de masa de impacto electrónico del extracto metanólico de las hojas de *Croton baillonianus*, los alcaloides reticulina y tembetarina, así como sus correspondientes estructuras glicosídicas²⁷.

Tamariz y col., demostraron que el látex de *Croton lechleri* presentó actividad frente a *Helicobacter pylori* cepa clínica (15,56 mm), por el método de difusión en disco²⁸.

Inostroza y col., evaluaron que el extracto hidroalcohólico de *Croton alnifolius* (tallos) presentó actividad leishmanicida similar al estibogluconato sódico (60 mg/kg por día) en animales de experimentación *Mesocricetus auratus* “hámster” frente a *Leishmania peruviana*²⁹.

Sandoval y col., demostraron que *Croton palanostigma*, posee actividad antioxidante sobre la mucosa gástrica en animales de experimentación. Reportándose la lipoperoxidación en el grupo basal $12,11 \pm 5,24$; grupo

injuría $22,58 \pm 6,3$; grupo control $14,6 \pm 5,4$; y grupo experimental $17,67 \pm 3,53$ ³⁰.

2.2. Familia Euphorbiaceae

La familia Euphorbiaceae a nivel morfológico está caracterizada por presentar “hierbas, arbustos o árboles, a veces lianas, raramente en Perú en forma carnosa o que simula algún cactus, a menudo más o menos lechoso. Hojas simples, enteras o dentadas pero lobuladas sólo en algunos géneros, a veces profundamente e incluso trifoliadas. Flores monoicas o dioicas, generalmente pequeñas y sin pétalos o también sin sépalos, a veces encerrado en un cáliz involucro. Androceo de 1 a muchos estambres. Ovario súpedo, 3(1-4)-lóculos con 1 o 2 óvulos oscilantes en cada lóculo. Estilos o estigmas tanto como o doble celdas ováricas. Cápsulas frecuentemente trilobulada, trivalvular. Embrión recto, los cotiledones planos casi tan ancho como el endospermo aceitoso carnoso”³¹.

La Euphorbiaceae es una familia amplia del reino Plantae que ocupa el sexto lugar después de Orchidaceae, Asteraceae, Fabaceae, Poaceae y Rubiaceae, pertenece al orden Euphorbiales, comprende aproximadamente 320 géneros y 8700 especies en el mundo, de las cuales en el Perú las Euphorbiaceae endémicas presentan 61 géneros y 323 especies^{3,32}. Debido a su amplia variedad son localizadas en zonas tropicales y subtropicales, así como también en regiones templadas de ambos hemisferios^{4,33}.

La importancia de esta familia es debido a su uso medicinal, alimentación, industria y ornamento³².

2.3. Género *Croton*

“Herbáceas o leñosas, usualmente lepidoto o estrellado-pubescentes, las hojas principalmente alternas y a menudo biglandular en la base o ápice de peciolo, casi nunca penninervia o lobado, las flores espinosas o racemosas comúnmente monoicas, el masculino generalmente dispuesto por encima de la hembra, estos a veces con pétalos, solitario bajo cada pequeña bráctea o a veces con 2-3 masculinos los cuales generalmente poseen pétalos con 5 segmentos de periantos, 5 o más estambres, erecto en la antesis. El perianto femenino 3-5 lobuladas, a veces irregularmente. El ovario de 3(2-4)-lóculos, el estilo 1 a muchas veces dividido; óvulos solitarios; cápsula separada en 3 cocos bivaldos; semillas carúnculadas lisas”³¹.

Croton es el segundo género más abundante de la familia *Euphorbiaceae* debido a su variedad y riqueza, por lo cual incluye más de 1200 especies³⁴. Presentan distribución cosmopolita³⁵ tanto en trópicos como subtrópicos en todo el mundo y de manera primordial en zonas áridas y semiáridas. Además de encontrar mayor variedad en Madagascar, Brasil y Caribe³⁴. En Perú se encuentra en diferentes regiones como los Bosques Húmedos, Mesoandina, Amazónico y Bosques Muy Húmedos Montanos, entre una altitud de 110 a 3200 metros sobre el nivel del mar, por lo cual es considerada una de las más numerosas en relación a las especies endémicas³.

Croton tiene alta importancia a nivel económico, debido a las propiedades que presentan sus especies vegetales, tales como medicinal, industrial, carcinogénicas y tóxicas³⁶.

2.4. Aspectos botánicos de las especies en estudio

2.4.1. *Croton adipatus* Kunth

2.4.1.1. Clasificación taxonómica

Según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist (1981):

REINO	:	Plantae
DIVISIÓN	:	Magnoliophyta
CLASE	:	Magnolopsida
SUBCLASE	:	Rosidae
ORDEN	:	Euphorbiales
FAMILIA	:	Euphorbiaceae
GÉNERO	:	<i>Croton</i>
ESPECIE	:	<i>Croton adipatus</i> Kunth

Sinónimos:

Oxydectes adipata (Kunth) Kuntze³⁷.

Nombres comunes:

Mosquera chica, ullucina³⁸.

2.4.1.2. Descripción botánica

“Ramillas dicotómicamente ramificadas, anguladas agudamente como los pecíolos, flores, como hojas arriba, lepidote con pequeños tricomas multirradiados, estos mediadamente lustrosos, obtusamente umbonados; pecíolos stout (estípulas obsoletas) carinado debajo, alrededor de 1 cm de largo; hojas

rómbico-ovadas, subobtusas en la base glandular o eglandular, acuminadas, enteras, rígidas pero frágiles, 3-4 cm de largo, 2-2,5 cm de ancho, 3-plinervadas, los nervios prominentes debajo, las escamas allí un poco más amplias, más pálidas y más lustrosas; racimos robustos, de 1-3 flores; pedicelos masculinos similares al cáliz escamoso, estos 2 mm de ancho antes de abrir; estambres alrededor de 15; filamentos glabros³⁸. (ver Figura 1)



Figura 1. *Croton adipatus* Kunth

2.4.1.3. Distribución geográfica

En Perú la especie se encuentra en los departamentos de Amazonas, Cajamarca y San Martín a una altitud 370-1100 m.s.n.m. Además se encuentra en Brasil, en la provincia de Bahía a una altitud 710-850 m.s.n.m.^{39,40}

2.4.1.4. Usos de la especie

La savia de las hojas y tallos se usa localmente para extraer las espinas de *Opuntia quitensis* y otras cactáceas; también para eliminar los hongos de las uñas del pie. Además se usa como cicatrizante de heridas, para el reumatismo, dolores musculares y como antipirético⁴¹.

2.4.2. *Croton thurifer* Kunth

2.4.2.1. Clasificación taxonómica

Según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist (1981):

REINO	:	Plantae
DIVISIÓN	:	Magnoliophyta
CLASE	:	Magnolopsida
SUBCLASE	:	Rosidae
ORDEN	:	Euphorbiales
FAMILIA	:	Euphorbiaceae
GÉNERO	:	<i>Croton</i>
ESPECIE	:	<i>Croton thurifer</i> Kunth

Sinónimos:

Oxydectes thurifera (Kunth) Kuntze⁴²

Nombres comunes:

Collishina o cullushina⁴³, "Sangre de Drago"⁴⁴, moshquero⁴⁵.

2.4.2.2. Descripción botánica

“Arbusto de 2 m de alto ligeramente estrellado y tomentoso con las hojas maso menos rómbicas, ovadas inequilaterales o redondas relacionadas a *C. alnifolius*, pero el primer par de nervios usualmente se alarga al menos hasta el medio de la hoja; pecíolos de 1-2,5 cm de largo, hispídos y densamente tomentulosas con ramas ligeramente anguladas; hojas oblicuamente redondeadas a agudas o frecuentemente

cuneadas en la base, redondeadas, obtusas o ligeramente agudas en el ápice, a menudo oblicuo, 3-8 cm de largo, 2-8 cm de ancho, más o menos glandular en la base, las glándulas a veces al menos cortamente estipeadas; racimos densos o laxos cuando están bien desarrollados a un dm de largo o más, el eje angulado; cálices femeninos cupulados, los pequeños segmentos ovalados no son acrescentes; ovario hispido y estrellado como los estilos cortos bastante rígidos debajo de la punta³⁸. (ver Figura 2)



Figura 2. *Croton thurifer* Kunth

2.4.2.3. Distribución geográfica

En el Perú la especie se encuentra en los departamentos de Amazonas, Cajamarca y La Libertad a una altitud de 400 - 1500 m.s.n.m. Además se encuentra en Ecuador, en la provincia de Loja⁴⁶.

2.4.2.4. Usos de la especie

El látex es utilizado como cicatrizante⁴⁴. La savia se usa localmente para extraer las espinas de *Opuntia quitensis* y otras cactáceas; también para eliminar los hongos de las uñas del pie⁴¹.

2.4.3. *Croton collinus* Kunth

2.4.3.1. Clasificación taxonómica

Según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist (1981):

REINO	:	Plantae
DIVISIÓN	:	Magnoliophyta
CLASE	:	Magnolopsida
SUBCLASE	:	Rosidae
ORDEN	:	Euphorbiales
FAMILIA	:	Euphorbiaceae
GÉNERO	:	<i>Croton</i>
ESPECIE	:	<i>Croton collinus</i> Kunth

Sinónimos⁴⁷:

Croton ferrugineus var. *collinus* (Kunth) Müll. Arg.,
Croton ferrugineus var. *peltoides* (Kunth) Müll. Arg.,
Croton peltoides Kunth.

Nombres comunes:

Mosquera³⁸

2.4.3.2. Descripción botánica

“Ramillas típicamente con indumentos cortos; pecíolos de 8-10 mm de largo o algo más largos; hojas ovadas, agudas, redondeadas o, a menudo, ligeramente peltadas en la base, 3-5 cm de largo, aproximadamente 3 cm de ancho, subentero u onduladas, verdes (típicamente) pero densamente estrelladas

por arriba, oscuras tomentosas por debajo, los nervios pinados prominentes; glándulas sésiles, 4 (en tipo) o aparentemente a menudo menos, generalmente 2 o incluso obsoleto u ocultas; racimos bastante cortos, brácteas masculinas 1-5 flores, pétalos y 15-18(20) filamentos pubescentes abajo; estilos bífidos. Como lo señala Mueller *C. peltoideus* HBK parece diferir poco del tipo, con ramillas algo hirsutas-tomentosas, hojas acuminadas peltadas, 1,5-3 cm de ancho, pecíolos de 12 mm de largo, glándulas 4-6, estambres 20 o más”³⁸. (ver Figura 3)



Figura 3. *Croton collinus* Kunth

2.4.3.3. Distribución geográfica

En el Perú la especie se encuentra en los departamentos de Amazonas, Cajamarca y La Libertad a una altitud de 370-2400 m.s.n.m. Además se encuentra en Ecuador, en la provincia de Loja y Bolivia, Cochabamba⁴⁶.

2.4.3.4. Usos de la especie

Exudado usado como cicatrizante de heridas⁴⁸. La salvia de las hojas y tallos es usada a nivel de la piel y tejidos subcutáneos para facilitar la expulsión de las espinas. Aplicable en el hombre y animales domésticos⁴⁹.

2.5. Aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas complejas de compuestos volátiles caracterizados por un fuerte olor característico propio de la especie de origen, son biosintetizados como metabolitos secundarios por las plantas aromáticas y generalmente son obtenidos por arrastre de vapor o por mecanismos mecánicos. Pueden ser sintetizados por todos los órganos de la planta y se almacenan en células secretoras, cavidades, canales, células epidérmicas o tricomas glandulares^{11,50,51}.

2.5.1. Métodos de extracción

Las propiedades de los aceites esenciales varían con el tipo de componentes que lo comprende y debido a la variabilidad de la proporción de los diferentes constituyentes. No solamente la factores como: el ciclo vegetativo, la condiciones climáticas, estación del año, composición química de la tierra de cultivo; influyen en la calidad del aceite esencial. El método de extracción también es un factor determinante, por lo cual es importante elegir el método más apropiado.

Existen diversos métodos que poseen ventajas y limitaciones según sean el objetivo de la extracción.

2.5.1.1. Destilación por arrastre de vapor

Se realiza mediante la inyección de vapor de agua a la muestra que contiene los aceites esenciales; el vapor cede el calor latente al producto y conlleva al cambio de fase de los aceites esenciales líquidas hasta su forma volátil, formando dos fases inmiscibles a lo largo del proceso de destilación; finalmente se condensan y pueden ser separados por decantación.

La destilación por arrastre de vapor es un método sencillo y de bajo costo; sin embargo, requiere largos tiempos de procesamiento y tiene bajo rendimiento^{51,52}.

2.5.1.2. Extracción con disolventes

Este método emplea disolventes orgánicos de distinto grado de polaridad para la extracción de los componentes volátiles. Los disolventes orgánicos solubilizan los componentes volátiles; así como, grasas y ceras que conforman las impurezas del producto final. La masa viscosa debe ser purificada para eliminar los disolventes orgánicos hasta límites permisibles y para separar las ceras y grasas de los aceites esenciales. Generalmente se utiliza el equipo Soxhlet para realizar la extracción en laboratorio; sin embargo, a nivel comercial resultaría costoso por el valor comercial de los disolventes orgánicos y por el riesgo que engloba el uso de tales componentes^{51,53}.

2.5.1.3. Extracción por fluidos supercríticos

Procedimiento en el cual se utiliza un gas inerte como el CO₂, el cual es enfriado y presurizado con una bomba hasta superar su punto crítico. El componente adquiere capacidad de difusión sobre los sólidos y buen poder disolvente que extrae los aceites esenciales y otros componentes. Las ventajas del método comprenden: el alto rendimiento de extracción, menor tiempo del proceso, la capacidad de fraccionar la composición a partir de los ajustes de los parámetros de extracción y el menor gasto de energía^{51,54}.

2.5.1.4. Extracción por microondas

Es un método que acopla un generador de microondas que incide en la muestra y un sistema de refrigeración para la

condensación de los componentes volátiles. Se emplea material fresco, se realiza en seco y no hay intervención de disolventes orgánicos^{51,53}.

2.5.2. Propiedades de los aceites esenciales

En diversos estudios de investigación se han reportado las propiedades medicinales de los aceites esenciales. Tales como: la propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antioxidantes, antiinflamatorias, anticancerígenas, antidiabéticas, antitoxigénicas, antiparasitarias, insecticidas, antimutagénica, antiprotozoarias, inmunomoduladoras, y antitumorales⁶⁻¹⁰.

2.5.3. Características fisicoquímicas

2.5.3.1. Solubilidad

Los aceites esenciales son solubles en disolventes orgánicos debido a su característica apolar. El grado de solubilidad es propio del tipo de aceite esencial evaluado⁵¹.

2.5.3.2. Densidad Relativa

Es una propiedad fisicoquímica notificada con más frecuencia, y es definida como la relación de las densidades de un aceite y del agua, cuando ambas están a temperaturas idénticas. El valor alcanzado es característico para cada aceite esencial. El picnómetro es un instrumento comúnmente usado para la medición de la densidad en líquidos^{50,55}.

2.5.3.3. Índice de Refracción

La determinación del índice de refracción, representa una constante física característica de un aceite esencial. Está representado por la relación del seno del ángulo de incidencia y

el seno del ángulo de refracción de un haz de luz que pasa de un medio menos denso (aire) a uno más denso (aceite esencial)^{50,55}.

2.5.4. Composición química

Los aceites esenciales están compuestos por dos grupos, la fracción volátil y la no volátil. Respecto a la fracción no volátil puede comprender flavonoides, ácidos grasos, ceras, carotenoides, entre otros. Mientras que la fracción volátil comprende a su vez dos grupos de compuestos que derivan de distintos orígenes biosintéticos. Los cuales son los terpenos y los compuestos aromáticos derivados del fenilpropano (C_6-C_3), respecto a este segundo grupo mencionado no son muy frecuentes, mientras que los terpenos son considerados como el grupo principal por la cantidad de variaciones estructurales que presenta debido a “la alta reactividad de las especies catiónicas intermediarias”^{51,56-58}.

De acuerdo al número de unidades isoprenicas (C_5) están conformados principalmente por monoterpenos (C_{10}) y sesquiterpenos (C_{15}); sin embargo, también son considerados los hemiterpenos (C_5), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}) y tetraterpenos (C_{40}). De estos los monoterpenos pueden comprender cerca del 90 % del aceite esencial. Químicamente están formados por el acoplamiento de dos unidades de isopreno (C_5) y el precursor es el geranilpírofosfato (GPP). De acuerdo a su estructura se clasifican según el número de ciclos como acíclicos, monocíclicos o bicíclicos. Y respecto a los grupos funcionales como: alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres, ésteres, fenoles o peróxidos^{11,51,57-59}. En la Tabla 1 y Figura 4 se muestran algunos ejemplos de monoterpenos.

Tabla 1. Ejemplos de monoterpenos de acuerdo a sus funciones y estructura^{11,51}.

Monoterpenos		
Alcoholes	Acíclicos	Geraniol, citronelol, nerol, linalol, lavandulol, etc.
	Monocíclicos	Mentol, α -terpineol, 1-terpinen-4-ol, carveol, etc.
	Bicíclicos	Borneol, fenchol, crisantenol, tujan-3-ol, etc.
Aldehídos	Acíclicos	Geranial, citronelal, neral, etc.
Carburos	Acíclicos	Mirceno, ocimeno, etc.
	Monocíclicos	Felandreno, terpineno, <i>p</i> -cimeno, etc
	Bicíclicos	Canfeno, -3-careno, pineno, sabineno, etc
Cetonas	Acíclicas	Tagetona
	Monocíclicas	Carvona, isomentona, mentona, piperitona, pulegona, etc.
	Bicíclicas	Alcanfor, fenchona, tuyona, ombelunona, pinocanfona, pinocarvone, etc.
Éteres	1,8-cineol, <i>dill</i> -éter, di o tetrahidrofuránicos, tetrahidropiránicos, mentofurano, etc.	
Ésteres	Acíclicos	Acetato o propionato de linalilo, acetato de citronelilo, etc.
	Monocíclicos	Acetato de mentilo, acetato de α -terpinilo, etc.
	Bicíclicos	Acetato de isobornilo, etc.
Fenoles	Carvacrol, timol, etc.	
Peróxidos	Ascaridol, etc	

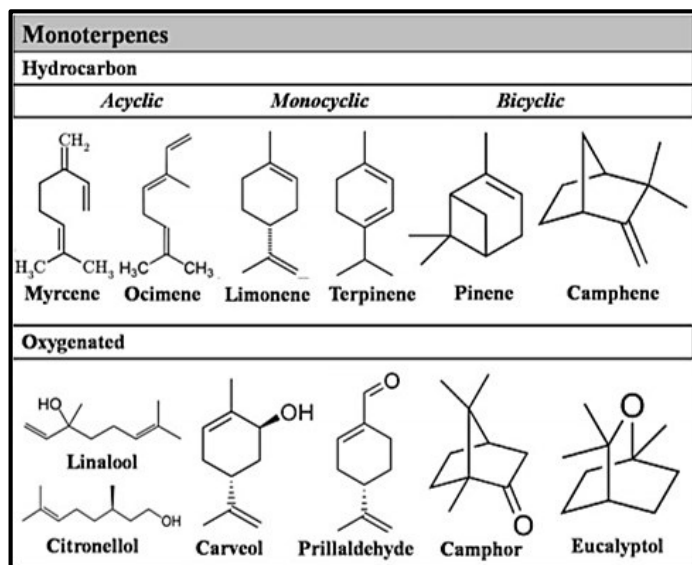


Figura 4. Clasificación y estructura química de algunos monoterpenos⁵⁶.

El farnesilpirofosfato (FPP) es el precursor de los sesquiterpenos y está formado por tres unidades de isopreno, este grupo también presenta variaciones estructurales tal como los monoterpenos (acíclicos, monocíclicos y bibíclicos), así mismo “el alargamiento de la cadena (FPP) aumenta el número de ciclaciones posibles, de ahí la amplia variedad de estructuras”^{11,51,58,59}. En la Tabla 2 y Figura 5 se muestra algunos ejemplos de sesquiterpenos.

Tabla 2. Ejemplos de sesquiterpenos de acuerdo a sus grupos funcionales^{11,51}.

Sesquiterpenos	
Alcoholes	Carotol, cedrol, bisabolol, farnesol, β -santalol, patchulol, β -nerolidol, viridiflorol, etc.
Aldehídos	Sinensales
Carburos	Azuleno, cadineno, curcumeno, elemenos, β -bisaboleno, β -cariofileno, farneseno, longifoleno, zingibereno, etc.
Cetonas	Germacreno, nootkatona, <i>cis</i> -longipinano-2, β -vetivona, 7-diona, turmerona, etc.
Epóxidos	Óxido de cariofileno, epóxidos de humuleno, etc
Ésteres	Acetato de cedrilo, etc.

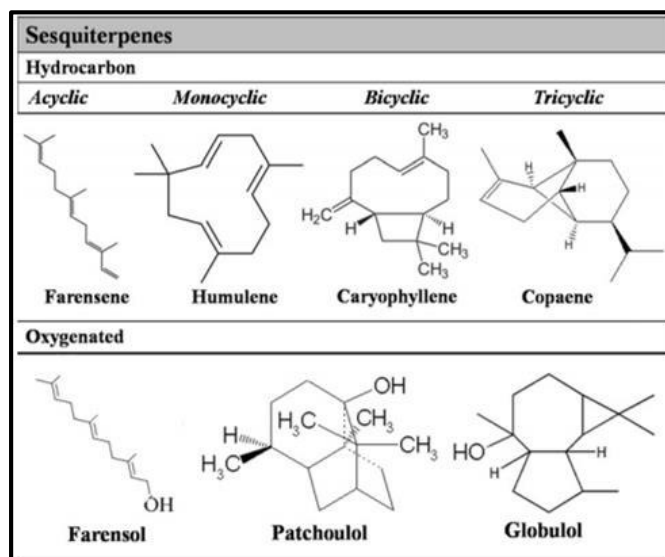


Figura 5. Clasificación y estructura química de algunos sesquiterpenos⁵⁶.

2.6. Métodos para evaluar la composición química de los aceites esenciales

Los aceites esenciales son mezclas complejas, por lo cual la identificación de sus componentes ha sido compleja. Antiguamente las técnicas analíticas no eran tan sofisticadas como en las últimas décadas, la realización era muy tediosa y requerían de mucho tiempo [Cromatografía en Capa Fina (CCF)]; sin embargo actualmente se cuenta con una amplia variedad de técnicas analíticas para analizar la composición química de los aceites esenciales como por ejemplo la Cromatografía de Gases (CG), la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), Espectrometría Infrarroja (IR), Espectrometría de Masas (EM), Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM) y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (CLAR/EM)^{50,55,56}. En la Tabla 3 se puede observar las ventajas y desventajas de las técnicas analíticas mencionadas.

Sin embargo la CG/EM se ha convertido en la principal herramienta para el análisis de los compuestos volátiles en los aceites esenciales debido a que permite identificarlas y cuantificarlas. Por otro lado si se desea analizar los componentes no volátiles se podría usar la CLAR⁵⁶.

El objetivo de la CG es separar los componentes de una muestra vaporizada, por lo que son evaporados y arrastrados por la fase móvil gaseosa (la fase móvil no interactúa con los componentes) a través de una fase estacionaria contenida en una columna. La separación de los componentes se da por los diferentes puntos de ebullición de los mismos y su afinidad por la fase estacionaria, después estos eluyen de la columna y conforme se van separando van ingresando al EM, el cual registra el espectro de cada componente. Y de este modo se les puede identificar y cuantificar⁶⁰.

Tabla 3. Ventajas y desventajas de diferentes técnicas analíticas para el análisis de composición química de los aceites esenciales^{50,55,60,61}.

Técnica analítica		Ventajas	Desventajas
Técnicas de separación	CCF	-Técnica simple, rápida y barata.	-Variabilidad de la respuesta sensorial. -Proporciona poca información cuantitativa, salvo que se use un densitómetro de barrido. -Baja resolución para mezclas complejas.
	CG	-Información cuantitativa. -Simple, confiable, robustez, alta sensibilidad y resolución. -Variedad de columnas y bases de datos.	-Limitada a compuestos volátiles y termoestables -Dependiendo del tipo de detector podría ser una técnica destructiva.
	CLAR	-Aporta información cuantitativa. -Análisis de componentes no volátiles o termolábiles.	-Para una buena identificación de los componentes, se requiere de cromatogramas estándares para su comparación. -Inadecuada separación de componentes en mezclas complejas. -Requiere de volúmenes de muestra significativos.
Técnicas espectrométricas	IR	-Análisis de componentes volátiles y no volátiles. -Identifica totalmente a las sustancias. -Técnica no destructiva.	-Poca sensibilidad y selectividad en el análisis de mezclas complejas. -Requiere de programas informáticos para una completa identificación (técnica costosa).
	EM	-Alta sensibilidad. -Abundancia de datos estructurales. -Identifica totalmente a los compuestos: masa y forma molecular.	-Técnica destructiva. -Requiere de sistemas computarizados para una completa identificación (técnica costosa). -Requiere acoplamiento de técnica cromatográfica para información cuantitativa.
Técnicas acopladas	CG/EM	-Alta sensibilidad y selectividad. -Información cuantitativa y cualitativa. -Separa e identifica compuestos en mezclas complejas.	-Requiere de sistemas computarizados para una completa identificación (técnica costosa). -Técnica destructiva. -Limitada para componentes no volátiles.
	CLAR/EM	-Alta selectividad -Información cuantitativa exacta, masa molecular y estructura.	-Baja resolución en mezclas complejas. -Requiere de sistemas computarizados para una completa identificación (técnica costosa).

Leyenda: **CCF:** Cromatografía en Capa Fina, **CG:** Cromatografía en Gas, **CLAR:** Cromatografía Líquida de Alta Resolución, **IR:** Espectrometría Infrarroja, **EM:** Espectrometría de Masas, **RMN:** Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear, **CG/EM:** Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, **CLAR/EM:** Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a Espectrometría de Masas.

2.7. Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana

Debido a la necesidad de estandarizar las pruebas microbiológicas se promovió la creación del Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS), actualmente el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI), para desarrollar y fomentar el uso de guías de prácticas clínicas y de laboratorio con la finalidad de conservar la calidad de los ensayos. Entre estas pruebas aceptadas por el CLSI, se encuentran: difusión en agar y dilución en caldo.

2.7.1. Difusión en agar

El método de difusión en agar es una prueba de susceptibilidad antimicrobiana que consiste en la difusión de un agente antimicrobiano de concentración conocida desde discos a través de un medio de cultivo donde ha sido sembrado un inóculo de estudio. Se determina la zona de inhibición o halo de inhibición que guarda relación con el poder antimicrobiano de la sustancia evaluada. El diámetro del halo de inhibición no solamente depende de la naturaleza química del antimicrobiano, sino también del grado de difusión de la sustancia evaluada⁶²⁻⁶⁶.

2.7.2. Dilución en caldo

El método de dilución en caldo es una prueba de gran difusión en la comunidad científica. Consiste en la evaluación de una concentración conocida del microorganismo prueba que es enfrentada contra un agente antimicrobiano o sustancia prueba, las concentraciones evaluadas son diluciones seriadas de la sustancia antimicrobiana. Generalmente se emplea la prueba de microdilución debido al bajo costo de recursos. La finalidad de esta prueba de susceptibilidad

antimicrobiana es la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)⁶⁶⁻⁶⁹.

2.7.3. Dilución en agar

El método de dilución en agar consiste en la evaluación de concentraciones seriadas de un agente antimicrobiano que es enfrentado a un inóculo conocido de un microorganismo determinado sobre la superficie del agar sólido^{66,68}.

2.8. Actividad antioxidante

2.8.1. Radicales libres (RL)

Los radicales libres son átomos o moléculas que tienen uno o más electrones desapareados en su última órbita, lo cual le da ciertas características: inestabilidad, alta reactividad y tiempo de vida media corta. Su objetivo es alcanzar su estabilidad electroquímica, captando el número de electrones que requiera de una molécula vecina, quien a su vez se convertirá en un nuevo RL. El proceso se repite provocando una reacción en cadena, y puede afectar hasta un millón de moléculas, desencadenando daño celular⁷⁰⁻⁷³.

Existen dos grupos de moléculas reactivas: las especies reactivas del oxígeno y nitrógeno (ERO y ERN)⁷³. Las especies reactivas de oxígeno son las siguientes: anión radical superóxido ($O_2^{\cdot -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($OH\cdot$), oxígeno singlete (1O_2), óxido nítrico ($NO\cdot$), peróxido ($ROO\cdot$), semiquinona (Q). De este grupo los más importantes son el anión superóxido (más abundante a nivel celular y se forma en la cadena de transporte de electrones), el peróxido de hidrógeno (no es considerado como radical libre, pero tiene la capacidad de generar el radical hidroxilo) y el radical hidroxilo (que es altamente reactivo)^{70,73}.

Por otro lado la producción de RL de fuente endógena cumplen un rol importante en la defensa contra bacterias y virus, favoreciendo la síntesis de prostaglandinas y colágeno, maduración de reticulocitos entre otros. En cantidades moderadas es beneficioso para el organismo, la situación cambia cuando los RL son generados por fuentes exógenas^{70,71,73,74}. (Ver Tabla 4)

Tabla 4. Fuentes de radicales libres⁷⁰.

Fuentes endógenas	Fuentes exógenas
-Mitocondria.	-Radiaciones (UV, rayos X, gamma).
-Citocromo p450.	-Contaminantes (ozono, hipocloritos, fibras de asbestos, óxido nítrico y dióxido de nitrógeno, sílice, toxinas, hipocloritos, paraquat, etc).
-Peroxisomas.	-Drogas (acetaminofeno, ciprofloxacino, antidepresivos tricíclicos, bleomicina, nitrofurantoínas, etc)
-Fagocitosis.	-Dieta (ácidos grasos poliinsaturados, etc).
-Xantina deshidrogenasa	-Otros (humo del cigarro, etc)

2.8.2. Estrés oxidativo

Los sistemas oxidantes en cantidades normales no afectan al organismo, ya que son neutralizadas por los antioxidantes endógenos; sin embargo, cuando la concentración de RL está incrementada provoca un desbalance, dando lugar al estrés oxidativo y afectando los procesos metabólicos. Como consecuencia provoca daños irreversibles en las células, ya que químicamente reacciona con lípidos, moléculas de ADN y proteínas. En varios estudios se concluyó que el estrés oxidativo es el responsable de diferentes enfermedades tales como Parkinson, diabetes mellitus, cáncer, Alzheimer, esclerosis, envejecimiento, aterosclerosis, cardiomiopatías entre otras^{71,73,74}.

2.8.3. Antioxidantes

Son moléculas capaces de donar electrones para estabilizar a los radicales desapareados y neutralizar los daños. Por lo tanto impide que otras moléculas se unan a las especies reactivas de oxígeno o nitrógeno, al reaccionar más rápido con los radicales libres. Esta acción lo realiza tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos⁷³⁻⁷⁴.

Los antioxidantes se clasifican de acuerdo a su origen como exógenos (adquiridos de la dieta), endógenos (producidos por el organismo), y no enzimáticos. Actúan de manera conjunta previniendo o controlando los niveles de RL que se producen y así evitar el daño que podrían causar^{70,71,74}. Ver Tabla 5.

Tabla 5. Clasificación de antioxidantes de acuerdo a su origen^{73,74}.

	Origen	Acción
Exógenos	Vitamina E	-Neutraliza el oxígeno singlete. -Captura radicales libres de hidroxilo. -Captura O ₂ . -Neutraliza peróxidos.
	Vitamina C	-Neutraliza el oxígeno singlete. -Captura radicales libres de hidroxilo. -Captura O ₂ . -Regenera la forma oxidada de la vitamina E.
	Betacarotenos	-Neutraliza el oxígeno singlete.
	Flavonoides, licopenos	
Endógenos	Enzimáticos	-Cofactor.
	Superóxido dismutasa	-Cobre, sodio, manganeso. -Cataliza la dismutación del oxígeno a peróxido de hidrógeno.
	Catalasa	-Hierro.
	Glutación peroxidasa	-Depende de selenio para catalizar la reacción de peróxido de hidrógeno a agua.
No enzimáticos	Glutación	-Barreras fisiológicas que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células.
	Coenzima Q	
	Ácido tioctico	-Transportadores de metales (transferrina y ceruloplasmina).

2.8.4. Métodos para evaluar la actividad antioxidante

Existen distintos métodos para evaluar las propiedades antioxidantes tal como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Clasificación de métodos para evaluar la actividad antioxidante⁷⁵.

Métodos <i>In vitro</i>	Métodos <i>In vivo</i>
-Actividad secuestradora de DPPH	-Capacidad reductora férrica del plasma
-Ensayo de captación de peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	-Estimación glutatión reducida (GSH)
-Actividad secuestrante de óxido nítrico (NO·)	-Estimación de glutatión peroxidasa (GSHPx)
-Actividad secuestrante del radical peroxinitrito (ONOO·)	-Glutatión-S-transferasa (GSt)
-Ensayo de decoloración de catión radical ABTS	-Método superóxido dismutasa (SOD)
-Ensayo de reducción de energía antioxidante férrica (FRAP)	- Ensayo de peroxidación lipídica (LPO)
-Actividad secuestrante del radical superóxido	-Ensayo de la actividad de γ-glutamyl transpeptidasa (GGT)
-Actividad secuestrante del radical hidroxilo	-Ensayo de glutatión reductasa (GR)
-Método de capacidad de absorbancia del radical de oxígeno (ORAC)	- Catalasa (CAT)
-Método del fosfomolibdeno	
-Método del tiocianato férrico (FTC)	
-Método del ácido tiobarbitúrico (TBA)	

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Materiales, reactivos y equipos

3.1.1.1. Material vegetal

Se usó las hojas secas de las siguientes especies vegetales:

- *Croton adipatus* Kunth
- *Croton thurifer* Kunth
- *Croton collinus* Kunth

3.1.1.2. Material biológico

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027
- *Candida albicans* ATCC 10231

3.1.1.3. Materiales

- Probeta florentino
- Embudo simple
- Beakers de vidrio 100 mL y 250 mL
- Probetas de vidrio 25 mL, 50 mL, 100 mL y 500 mL
- Pipetas de vidrio 1 mL, 2 mL, 5 mL y 10 mL
- Fiolas de vidrio 25 mL, 50 mL y 100 mL
- Placas Petri de vidrio
- Tubos de ensayo de vidrio
- Frascos de vidrio ámbar 5 mL, 10mL y 25 mL
- Viales de vidrio ámbar
- Baguetas de vidrio

- Tips de 100 μL y 1000 μL
- Cubeta espectrofotométrica
- Picnómetro de 1 mL
- Sacabocados
- Micropipetas
- Micropipeta multicanal
- Microplaca estéril de 96 pozos con fondo en U (SPL)

3.1.1.4. Reactivos

Los reactivos fueron adquiridos de Merck, Sigma-Aldrich y Movilab.

- Agua destilada
- Dimetilsulfóxido
- Resazurina
- Sulfato de sodio anhidro
- DPPH: Ácido 1, 1-difenil-2-picrilhidrazilo
- Vitamina C
- Cloruro de sodio
- Polisorbato 20

3.1.1.5. Medios de cultivo

- Agar Tripticasa Soya (Merck)
- Agar Mueller Hinton (Merck)
- Agar Dextrosa Sabouraud al 4% (Merck)
- Caldo Glucosa 2% según Sabouraud (Merck)
- Caldo Mueller Hinton (Merck)
- Medio RPMI 1640 con glutamina sin bicarbonato (Sigma-Aldrich)
- Buffer ácido morfolino propanosulfónico (MOPS) (Sigma-Aldrich)

3.1.1.6. Equipos

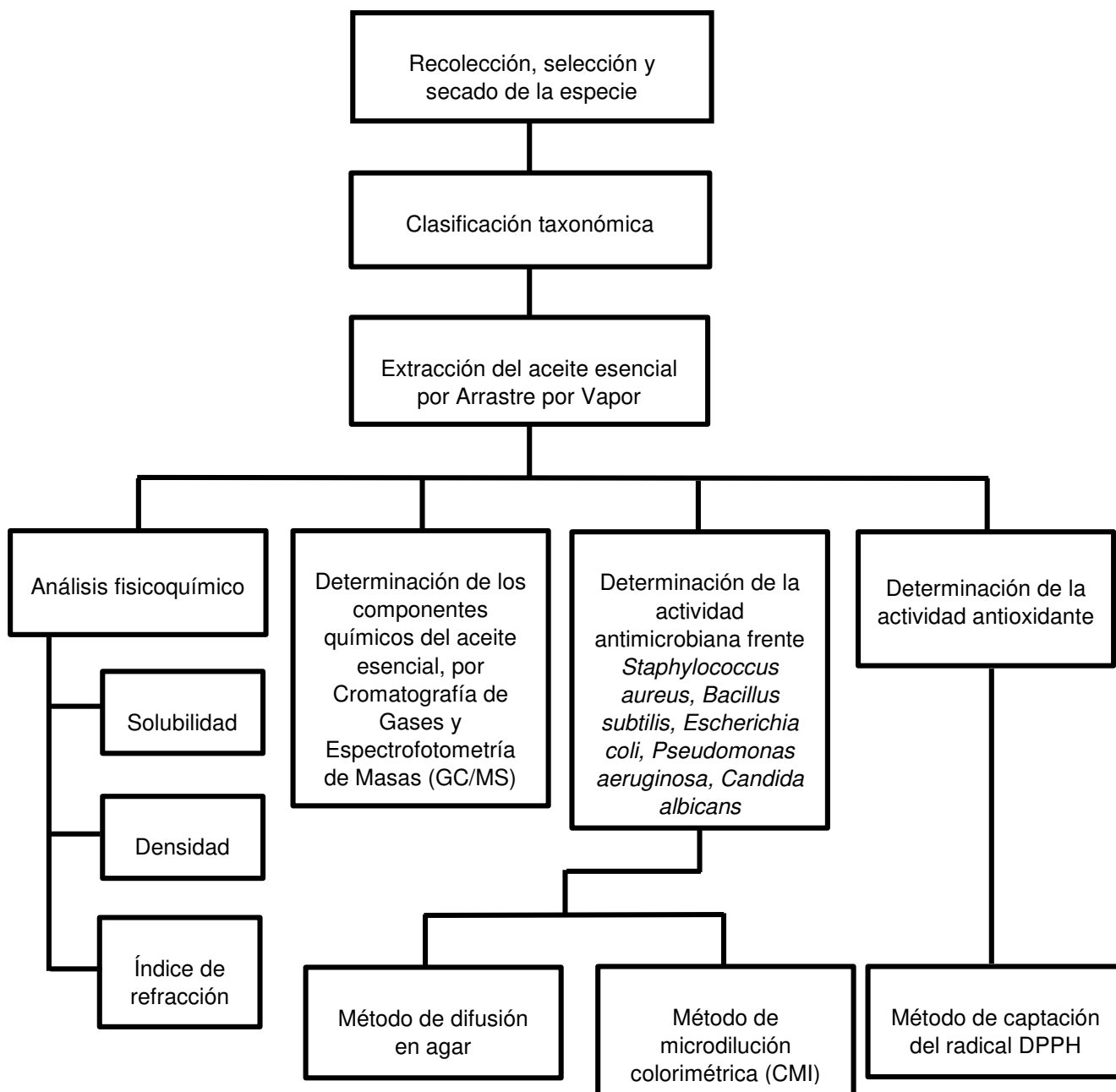
- Equipo de destilación por arrastre de vapor de acero inoxidable
- Balanza analítica (Acculab)
- Autoclave (ALP)
- Estufa (Memmert)
- Refrigeradora (Coldex)
- Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890 con detector espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C
- Incubadora (Incucell)
- Espectrofotómetro: Espectro UV-Visible (Thermo Fisher Scientific)
- Balanza (Sartorius)

3.1.2. Entidades donde se desarrolló la investigación

La extracción por destilación con arrastre de vapor de agua, se desarrolló en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. La determinación cualitativa y cuantitativa de los componentes de las especies vegetales en estudio se efectuó en el laboratorio de Productos naturales de la Unidad de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. La evaluación de la actividad antimicrobiana se desarrolló en el laboratorio de Microbiología del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco A. Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM. Los análisis fisicoquímico y antioxidante se realizaron en el laboratorio de Orgánica del Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales “Juan de Dios Guevara” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

3.1.3. Metodología

3.1.3.1. Flujograma del trabajo experimental



3.1.3.2. Tipo de estudio

Descriptivo y prospectivo.

3.1.3.3. Recolección e identificación de las especies vegetales

Las especies vegetales *Croton adipatus* Kunth y *Croton thurifer* Kunth fueron recolectadas en la localidad “El almendral”, Distrito Jaén, Provincia Jaén, Departamento Cajamarca, a una altitud de 650 m.s.n.m., y la especie *Croton collinus* Kunth, fue recolectada en la localidad “Jahuanga”, Distrito Bagua grande, Provincia Utcubamba, Departamento Amazonas, a una altitud de 700 m.s.n.m. el mes de Junio del 2017.

Posteriormente las hojas fueron separadas del tallo y se sometieron a un proceso de secado al aire libre, evitando la exposición a la luz solar directa con la finalidad de conservar los componentes volátiles y así mismo lograr un mayor tiempo de almacenaje⁷⁶. Luego se empaquetaron y etiquetaron para su transporte.

La identificación y clasificación taxonómica de las especies vegetales fueron desarrolladas por el biólogo José Campos de la Cruz, consultor botánico. (Anexos 2-7)

3.1.3.4. Extracción de los aceites esenciales

La extracción de los aceites esenciales se basó en el método de destilación por arrastre de vapor de agua⁷⁷. Se acondicionó el equipo de hidrodestilación y se pesaron 10 Kg de hojas secas de cada especie vegetal estudiada. En cada ciclo de extracción se emplearon 13 litros de agua por cada kilo de muestra, por un periodo de 2 horas, para luego ser recepcionados en una

probeta florentino donde se separa el agua del aceite por diferencia de densidad.

La fracción de los aceites esenciales extraídos se deshidrató con sulfato de sodio anhidro, para lograr eliminar los últimos restos de agua. Finalmente se almacenaron en recipientes de vidrio ámbar con cierre hermético a 4 °C, hasta los análisis.

3.1.3.5. Análisis preliminar de los aceites esenciales

Se determinó por el método gravimétrico – volumétrico el porcentaje de rendimiento del Aceite Esencial (% RAE) con la siguiente expresión⁷⁸:

$$\% \text{ RAE} = \text{Vol.AE (mL)} / \text{P}_{\text{muestra}} \text{ (g)} \times 100$$

Donde:

Vol.AE: Volumen del aceite esencial obtenido en mililitros.

P_{muestra}: Peso de la muestra a destilar en gramos.

Así mismo, se realizó el análisis organoléptico, solubilidad y el análisis fisicoquímico determinándose las principales constantes físicas: índice de refracción y la gravedad específica⁷⁹.

3.1.3.6. Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM) de aceites esenciales

Para el análisis de cada muestra se utilizó 20 µL del aceite esencial en 980 µL de diclorometano, que fueron luego inyectados en el cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A acoplado a un detector selectivo de masas Agilent Technologies 5975C. La separación de los compuestos de la mezcla fue llevada a cabo mediante una columna capilar apolar

DB-5MS (60 m x 250 μ m x 0,25 μ m) (J & W de 5% fenil metilpolisiloxano). La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C y la inyección se realizó en modo split (20:1). El programa de temperaturas del horno fue como sigue: temperatura inicial de 50 °C; posteriormente luego se incrementó a 2,5 °C/min hasta 180 °C, 10 °C/min hasta 200 °C, y finalmente a 20 °C/min hasta 240 °C. El tiempo de corrida fue de 56 minutos, utilizando helio como gas de arrastre a un flujo constante de 1mL/min. Los constituyentes de los aceites esenciales fueron identificados por comparación de los espectros de masas de cada pico con los de la librería de espectros de masas de las bases de datos Flavor 2 y la del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, 08). Este análisis se realizó en el laboratorio de la Unidad de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Ciencias y Filosofía “Alberto Cazorla Talleri” de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

3.1.3.7. Actividad antimicrobiana

3.1.3.7.1. Método de difusión en agar

Se basa en la formación de halos claros debido a la difusión de las sustancias activas en un medio sólido que expresan la zona de inhibición del crecimiento de los microorganismos evaluados⁶²⁻⁶⁵.

a) Microorganismos de estudio

Se utilizaron los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y la levadura *Candida albicans* ATCC 10231 del Laboratorio de

Microbiología del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco A. Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

b) Preparación del inóculo

Las bacterias y la levadura fueron subcultivadas en agar Tripticasa Soya y en agar Dextrosa Sabouraud respectivamente 24 horas antes de la prueba. Se preparó la suspensión de los microorganismos en solución salina 0,9% estéril con ayuda de una asa de Kohle y se ajustó la turbidez según el tubo 0,5 de la escala de McFarland que corresponde a una concentración aproximada de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL para las bacterias y $1-5 \times 10^6$ UFC/mL para las levaduras^{65,66,80}.

c) Preparación de las muestras

Las muestras de los aceites esenciales de las especies en estudio se trabajaron a las concentraciones de 10%, 50% y 95%, utilizando como solvente DMSO.

d) Controles

Para el ensayo se utilizó como controles positivos Ciprofloxacino (0,05 mg/mL) y Ketoconazol (0,2 mg/mL) disuelto en agua y DMSO, respectivamente. Los controles del solvente (DMSO) se incluyeron en cada experimento como controles negativos. Las pruebas se realizaron por triplicado y se trabajaron bajo las mismas condiciones de las muestras de los aceites esenciales en estudio.

e) Preparación de las placas

Se utilizó el agar Mueller Hinton para las bacterias y el agar Dextrosa Sabouraud para la levadura, previamente reconstituidos con agua destilada, esterilizados por autoclavado, enfriados y mantenidos a 45°C – 50°C. Estos fueron inoculados con 0,4 mL de suspensión del inóculo por cada 100 mL de medio de cultivo, seguidamente se homogenizó y se distribuyó en placas Petri de vidrio estériles de 90 mm de diámetro, a razón de 25 mL por placa. Se dejó solidificar y se rotuló con el nombre del microorganismo evaluado. Finalmente se hicieron pozos con la ayuda de un sacabocado de acero de 9 mm de diámetro externo, los sobrantes se retiraron con el asa de Kohle. Cada microorganismo se trabajó por triplicado.

f) Incorporación de las muestras e incubación de las placas

Se incorporó 100 µL de las concentraciones de los aceites esenciales en estudio (10%, 50%, y 95%) de las diferentes muestras en los pozos, luego se dejó reposar por 30 minutos bajo refrigeración para favorecer la difusión de los aceites esenciales y evitar la proliferación de los microorganismos, seguidamente se llevó a incubación en estufa a 37 °C por 24 horas. Cada concentración se evaluó por triplicado.

g) Lectura de los resultados

Luego de la incubación se observaron la presencia de las zonas de inhibición del crecimiento (halos claros) y

se midieron los diámetros en mm. Se consideró que tiene una actividad antimicrobiana significativa a una zona perfectamente clara con un diámetro mayor de 18 mm⁶².

3.1.3.7.2. Método de microdilución colorimétrica para la determinación de la CMI

Se basa en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del crecimiento de los microorganismos, expresado como la ausencia del cambio de coloración púrpura de la resazurina (indicador de la ausencia de células viables)⁶⁷.

Estas pruebas se hicieron siguiendo los protocolos del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés). Para las pruebas con bacterias se usó el protocolo CLSI M07-A10 modificado⁶⁸, y para *Candida albicans* se usó el protocolo CLSI M27-A3⁶⁶, y las modificaciones de Liu M y col⁶⁹.

a) Microorganismos de estudio

Se utilizaron los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y la levadura *Candida albicans* ATCC 10231 del Laboratorio de Microbiología del Instituto de Química Biológica, Microbiología y Biotecnología “Marco A. Garrido Malo” de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

b) Preparación del inóculo

Se realizó el repique de los microorganismos en estudio 24 horas antes de la prueba en agar Trypticase Soya para las bacterias, y agar Dextrosa Sabouraud para la levadura, incubado a condiciones aerobias a 37 °C.

El día del ensayo, se preparó la suspensión de los microorganismos en solución salina 0,9% estéril con ayuda de una asa de Kohle y se ajustó la turbidez según el tubo 0,5 de la escala de McFarland que corresponde a una concentración aproximada de $1-2 \times 10^8$ UFC/mL para las bacterias y $1-5 \times 10^6$ UFC/mL para las levaduras.

A continuación para las bacterias se realizó las diluciones consecutivas de 1:30 y 1:5 con caldo Mueller Hinton para obtener un inóculo de $6,6 - 13,3 \times 10^5$ UFC/mL (inóculo 2x). Para la levadura se realizó las diluciones consecutivas de 1:50 y 1:20 con medio RPMI 1640 para obtener un inóculo de $1-5 \times 10^3$ UFC/mL (inóculo 2x).

Por cada 20 mL de las suspensiones de los inóculos 2x (bacterias o levaduras) se agregó 0,1 mL de la solución de resazurina 20 mg/mL que fue previamente preparada en condiciones asépticas utilizando un filtro de 0,22 μm ⁶⁹.

c) Preparación de las muestras

Las soluciones madres de los aceites esenciales se prepararon a concentración de 80 $\mu\text{L/mL}$ [aceite esencial (80): polisorbato 20 (50): caldo Mueller Hinton (870)],

para las pruebas en bacterias o concentración de 80 $\mu\text{L/mL}$ [aceite esencial (80): polisorbato 20 (50): caldo RPMI 1640 (870)], para la prueba en levadura. Las concentraciones finales (x) de las muestras fueron desde 0,079 a 40 $\mu\text{L/mL}$. Para obtener las 10 diluciones triplemente seriadas de las concentraciones finales (2x) correspondiente al rango de 0,157 - 80 $\mu\text{L/mL}$; se agregaron para tres filas: 100 μL de caldo Mueller Hinton (bacterias) o caldo RPMI 1640 (levadura), desde la columna 3 a la columna 12. Después se adicionó 100 μL de la solución patrón según corresponda (bacteria o levadura) en la columna 2 y la columna 3 de la placa de microdilución. A continuación, se tomaron 100 μL de la columna 3 (200 μL) y se pasaron a la 4, y así hasta llegar a la columna 11. Los últimos 100 μL provenientes de la columna 11 fueron desechados. La concentración final de polisorbato 20 fue igual o inferior al 2,5 % (v/v). (ver Tabla 7)

Tabla 7. Dilución de los aceites esenciales.

Dilución de los aceites esenciales								
Paso	Concentración inicial $\mu\text{L/mL}$	Fuente (tubo)	Volumen transferido μL	Volumen μL (M o R)	Volumen intermedio μL	Volumen final	Concentración Final (2x) Resultante $\mu\text{L/mL}$	Tubo
1	80	Stock	100	-	100	100	80	Nº2
2	80	Stock	100	100	200	100	40	Nº3
3	40	Nº3	100	100	200	100	20	Nº4
4	20	Nº4	100	100	200	100	10	Nº5
5	10	Nº5	100	100	200	100	5	Nº6
6	5	Nº6	100	100	200	100	2,5	Nº7
7	2,5	Nº7	100	100	200	100	1,25	Nº8
8	1,25	Nº8	100	100	200	100	0,625	Nº9
9	0,625	Nº9	100	100	200	100	0,313	Nº10
10	0,313	Nº10	100	100	200	100*	0,157	Nº11

Leyenda: M: caldo Mueller Hinton R: caldo RPMI 1640 (*) Los 100 μL sobrantes se desechan.

d) Preparación de los controles

Los controles positivos utilizados para las pruebas fueron Ciprofloxacino, para las bacterias, y Ketoconazol para la levadura. El Ciprofloxacino se solubilizó en agua y fue preparado a 6400 $\mu\text{g/mL}$, mientras que el Ketoconazol se solubilizó en DMSO y fue preparado a 1600 $\mu\text{g/mL}$, siguiendo las recomendaciones del CLSI. Las concentraciones finales (x) de los controles fueron desde 0,125 a 64 $\mu\text{g/mL}$ y desde 0,0313 a 16 $\mu\text{g/mL}$ para Ciprofloxacino y Ketoconazol respectivamente.

Para obtener las 10 diluciones triplemente seriadas de las concentraciones finales (2x) correspondiente al rango de 0,250 a 128 $\mu\text{g/mL}$ y desde 0,063 a 32 $\mu\text{g/mL}$ para Ciprofloxacino y Ketoconazol respectivamente; se agregaron para tres filas: 100 μL de caldo Mueller Hinton

(bacterias) o caldo RPMI 1640 (levadura), desde la columna 3 a la columna 12. Después se adicionó 100 µL de la solución patrón según corresponda (bacteria o levadura) en la columna 2 y la columna 3 de la placa de microdilución. A continuación, se tomaron 100 µL de la columna 3 (200 µL) y se pasaron a la 4, y así hasta llegar a la columna 11. Los últimos 100 µL provenientes de la columna 11 fueron desechados. Se utilizó como control de esterilidad el caldo Mueller Hinton con resazurina en el caso del Ciprofloxacino y el medio RPMI 1640 con resazurina de acuerdo al protocolo de Liu M y col. en el caso de Ketoconazol⁶⁹. (ver Tablas 8 y 9)

Tabla 8. Dilución del Ciprofloxacino.

Dilución del ciprofloxacino								
Paso	Concentración inicial µg/mL	Fuente (tubo)	Volumen transferido µL	Volumen µL (M)	Volumen intermedio µL	Volumen final	Concentración Final (2x) Resultante µg/mL	Tubo
1	128	Stock	100	-	100	100	128	Nº2
2	128	Stock	100	100	200	100	64	Nº3
3	64	Nº3	100	100	200	100	32	Nº4
4	32	Nº4	100	100	200	100	16	Nº5
5	16	Nº5	100	100	200	100	8	Nº6
6	8	Nº6	100	100	200	100	4	Nº7
7	4	Nº7	100	100	200	100	2	Nº8
8	2	Nº8	100	100	200	100	1	Nº9
9	1	Nº9	100	100	200	100	0,5	Nº10
10	0,5	Nº10	100	100	200	100*	0,250	Nº11

M: caldo Mueller Hinton (*) Los 100 µL sobrantes se desechan.

Tabla 9. Dilución del Ketoconazol.

Dilución del Ketoconazol								
Paso	Concentración inicial $\mu\text{g/mL}$	Fuente (tubo)	Volumen transferido μL	Volumen μL (R)	Volumen intermedio μL	Volumen final	Concentración Final (2x) Resultante $\mu\text{g/mL}$	Tubo
1	32	Stock	100	-	100	100	32	Nº2
2	32	Stock	100	100	200	100	16	Nº3
3	16	Nº3	100	100	200	100	8	Nº4
4	8	Nº4	100	100	200	100	4	Nº5
5	4	Nº5	100	100	200	100	2	Nº6
6	2	Nº6	100	100	200	100	1	Nº7
7	1	Nº7	100	100	200	100	0,5	Nº8
8	0,5	Nº8	100	100	200	100	0,250	Nº9
9	0,250	Nº9	100	100	200	100	0,125	Nº10
10	0,125	Nº10	100	100	200	100*	0,063	Nº11

R: caldo RPMI 1640 (*) Los 100 μL sobrantes se desechan.

e) Procedimiento de la prueba de microdilución colorimétrica

El ensayo de microdilución colorimétrica fue realizada en microplacas estériles de 96 pocillos de fondo en U⁶⁹.

La distribución referencial de las muestras y controles se realizó teniendo en cuenta el diseño modelo (Tabla 7-9).

Una vez obtenidas, las concentraciones seriadas según sea el tipo de muestra (paso c) o control positivo (paso d), se agregó 100 μL del inóculo 2x con el indicador resazurina desde la columna 2 hasta la 12 (paso b). Por otro lado también se consideraron pozos de control de esterilidad en la columna 1 (caldo Mueller Hinton o medio RPMI 1640, conteniendo resazurina) y pozos de control de crecimiento (caldo Mueller Hinton con inóculo de las

bacterias en estudio o RPMI 1640 con inóculo de *Candida albicans*). Al finalizar, las microplacas fueron rotuladas y cubiertas en bolsas de polietileno para evitar la volatilización de las muestras⁸¹. Las microplacas se incubaron a 37 °C por 24 h en condiciones aerobias.

f) Lectura de los resultados

Se realizó visualmente y consideró como resultado positivo a cualquier cambio de color de púrpura (resazurina) a rosado resorufina⁶⁹. (ver Figura 6)

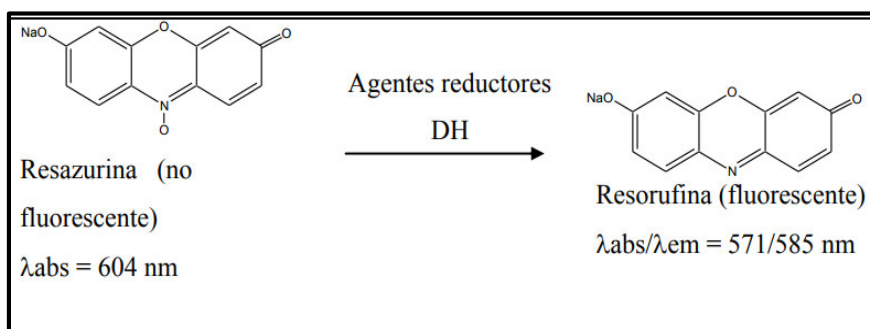


Figura 6. Reacción de oxidación de Resazurina⁸².

Los valores de CMI se definen como la concentración más baja de aceite esencial en estudio que impide un cambio de color de la resazurina⁶⁷. El promedio de tres valores fueron calculados y se reportaron como la CMI.

g) Interpretación de los resultados

Al no contar con una clasificación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales, se tomó en cuenta los parámetros de Holetz y col.⁸³, de manera referencial. (ver Tabla 10)

Tabla 10. Interpretación de resultados para Concentración Mínima Inhibitoria

Actividad antimicrobiana	CMI
Inactivo	> 1000 µg/mL
Débil actividad	500 a 1000 µg/mL
Moderada actividad	100 a < 500 µg/mL
Buena actividad	< 100 µg/mL

3.1.3.8. Determinación de la capacidad antioxidante por captación del radical 1,1-difenil-2-2-picril-hidrazilo (DPPH)^{75, 84, 85}

Se basa en la determinación del grado de pérdida de la coloración violeta (radical libre estable), como resultado de la donación de un átomo de hidrógeno proveniente del sustrato antioxidante.

La molécula 1,1-difenil-2-2-picril-hidrazilo (DPPH) debido a la presencia de un electrón desapareado posee coloración violeta, caracterizado por una banda de absorción centrada a aproximadamente 517 nm en una solución de metanol. (ver Figura 7)

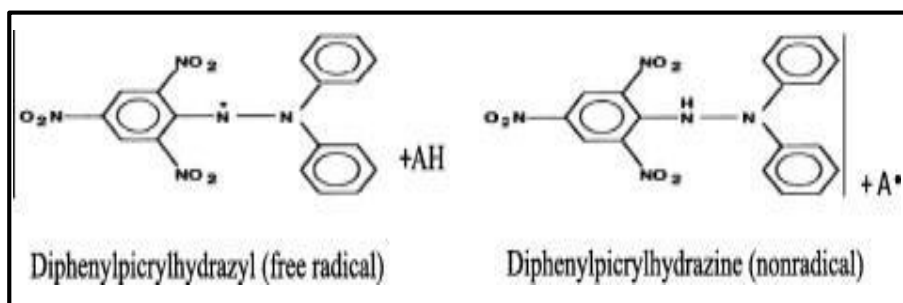


Figura 7. Reacción de DPPH⁷⁵.

3.1.3.8.1. Procedimiento

Se preparó la solución stock de 20 mg/L de 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) en metanol y se almacenó a 4°C protegido de la luz. Luego se realizó una serie de soluciones metanólicas iniciales de los aceites esenciales de *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth. (Ver Tabla 11) Seguidamente se agregó 800 µL de la solución de trabajo de DPPH y se agitó. Finalmente se dejaron en reposo durante 30 minutos protegidos de la luz y se leyó a una longitud de onda de 517 nm. Las concentraciones fueron realizadas por triplicado.

Tabla 11. Preparación de las muestras para la prueba de Captación del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH).

Tubos	A	B	C	D	E	F	DPPH	Blanco
Concentración inicial (µL/mL)	75	60	30	10	3	1	-	-
Muestra (mL)	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	-	0,4
Metanol (mL)	-	-	-	-	-	-	0,4	0,8
DPPH (mL)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	-
Total (mL)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Concentración final (µL/mL)	25	20	10	3,3	1	0,3	-	-

Con los valores de absorbancia obtenidos se determinó el porcentaje de captación de radicales libres mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ Inhibición de DPPH} = \frac{\text{Abs. DPPH} - \text{Abs. muestra}}{\text{Abs. DPPH}} \times 100$$

También se determina la IC₅₀ definida como la concentración necesaria del antioxidante que se requiere para inhibir el 50% del radical libre. Se usó como estándar antioxidante a la vitamina C (Tabla 12).

Tabla 12. Preparación de la Vitamina C para la prueba de Captación del radical libre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH).

Tubos	A	B	C	D	DPPH	Blanco
Concentración inicial (µg/mL)	10	7,5	5	2,5	-	-
Vitamina C (mL)	0,4	0,4	0,4	0,4	-	0,4
Metanol (mL)	-	-	-	-	0,4	0,8
DPPH (mL)	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	-
Total (mL)	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
Concentración final (µg/mL)	3,3	2,5	1,6	0,8	-	-

3.1.3.9. Análisis estadístico

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de Tukey.

IV. RESULTADOS

4.1. Análisis preliminar de los aceites esenciales

Las Tablas 13 y 14 muestran las características organolépticas, propiedades fisicoquímicas y rendimiento de los aceites esenciales de las especies vegetales en estudio.

Tabla 13. Análisis de las características organolépticas de los aceites esenciales en estudio.

	<i>Croton adipatus</i> Kunth	<i>Croton thurifer</i> Kunth	<i>Croton collinus</i> Kunth
Aspecto	Líquido oleoso translúcido	Líquido oleoso translúcido	Líquido oleoso translúcido
Color	(+)	(++)	(+++)
Olor	Fuerte olor aromático	Fuerte olor aromático	Fuerte olor aromático
Sabor	Sui géneris	Sui géneris	Sui géneris
Leyenda: (+) amarillo pálido; (++) amarillo pálido a amarillo intenso; (+++) amarillo intenso			

Tabla 14. Propiedades fisicoquímicas y rendimiento de los aceites esenciales en estudio.

	<i>Croton adipatus</i> Kunth	<i>Croton thurifer</i> Kunth	<i>Croton collinus</i> Kunth
Solubilidad	Insoluble en agua y etanol 50 por cierto, soluble en metanol, DMSO y etanol absoluto.	Insoluble en agua y etanol 50 por cierto, soluble en metanol, DMSO y etanol absoluto.	Insoluble en agua y etanol 50 por cierto, soluble en metanol, DMSO y etanol absoluto.
Densidad (25°C)	0,9064 g/mL	0,9371 g/mL	0,9117 g/mL
Índice de refracción	1,4715	1,4800	1,4845
Rendimiento	0,47%	0,07%	0,06%

4.2. Cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM) de aceites esenciales

4.2.1. Cromatografía de gases/espectrometría de masas de *Croton adipatus* Kunth

En el análisis por Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM) del aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth, se identificaron 46 compuestos que comprenden el 100% de la composición total del aceite esencial; en la siguiente Tabla 15 se muestra la composición química, mientras que en la Figura 8 y Anexo 8 se observa el cromatograma y en las Figuras 9-11 los espectros de los componentes con mayor porcentaje del aceite esencial.

Tabla 15. Composición química del aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth determinado por Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas.

Nº	Nombre del compuesto	t _R (min)	% en la muestra
1	éster 2-metil-2-metilpropil del ácido propanoico	14,39	0,20
2	α-Thuyeno	15,22	12,69
3	1R-α-Pineno	15,65	3,64
4	Sabineno	17,74	3,17
5	β-Pineno	18,09	1,55
6	β-Mirceno	18,55	18,34
7	α-Felandreno	19,65	8,19
8	Éster isopentilo del ácido Isobutírico	19,92	0,53
9	α-Terpineno	20,20	0,56
10	o-Cimeno	20,65	1,38
11	D-Limoneno	20,97	10,94
12	β-Felandreno	21,11	4,94
13	Eucaliptol	21,18	0,70
14	cis-Ocimeno	21,75	0,43
15	τ-Terpineno	22,58	3,21
16	β-Terpineol	23,31	0,44
17	Terpinoleno	24,16	0,16

N°	Nombre del compuesto	t _R (min)	% en la muestra
18	β-Linalool	24,87	0,40
19	1,6-Dimetilhepta-1,3,5-trieno	26,35	0,47
20	4-Terpineol	29,81	0,74
21	2-Decanona	30,17	0,17
22	α-Terpineol	30,60	0,12
23	2-Undecanona	33,87	2,16
24	2-Dodecanona	35,91	4,56
25	2-Careno	38,41	0,56
26	Desconocido (C ₁₅ H ₂₄)	40,92	0,15
27	β-Elemeneno	41,35	6,47
28	2-etil-1,3-dimetil-Benceno	42,26	0,24
29	β-Cariofileno	43,05	0,28
30	δ-Elemeneno	43,35	0,71
31	Nerilacetona	44,07	0,16
32	α-Muuroleno	45,97	0,45
33	Germacreno D	46,17	4,78
34	α-Selineno	46,58	0,39
35	Biciclogermacreno	46,86	1,24
36	Isobutirato de Geranilo	47,02	0,41
37	δ-Cadineno	47,12	0,48
38	Desconocido (C ₁₅ H ₂₄)	47,81	0,31
39	Elemol	49,29	1,61
40	Desconocido (C ₁₅ H ₂₄)	49,99	0,69
41	Desconocido (C ₁₅ H ₂₆ O)	52,77	0,51
42	β-Maalieno	53,19	0,11
43	Desconocido (C ₁₅ H ₂₆ O)	53,60	0,10
44	τ-Muurolol	54,01	0,16
45	Desconocido (C ₁₅ H ₂₆ O)	54,08	0,38
46	Heptadecano	55,05	0,12

Leyenda: (N°) número; (t_R) Tiempo de Retención

4.2.1.1. Cromatograma CG/EM del aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth

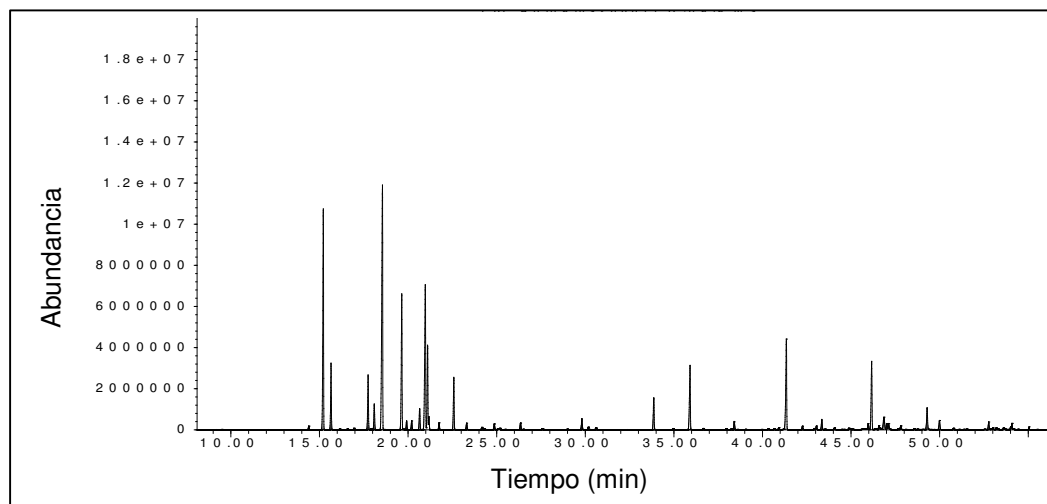


Figura 8. Cromatograma CG/EM del aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth.

4.2.1.2. Espectros de los componentes con mayor porcentaje del aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth

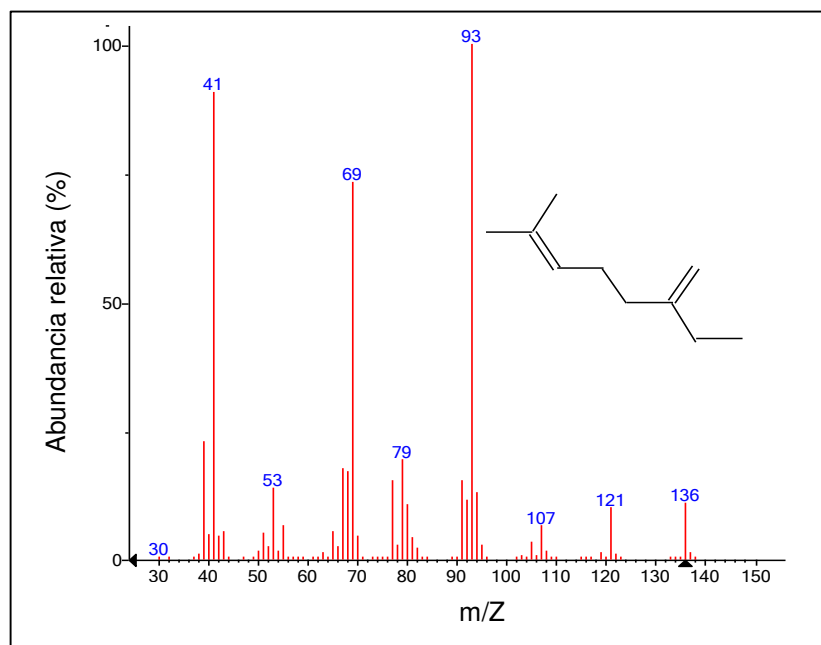


Figura 9. Espectro de la estructura β-mirceno del aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth.

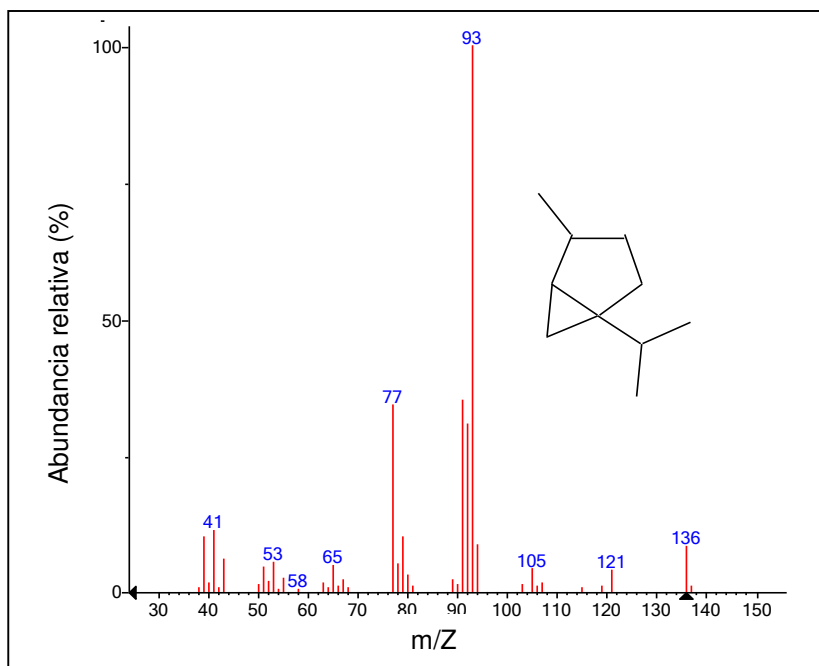


Figura 10. Espectro de la estructura α-thuyeno del aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth.

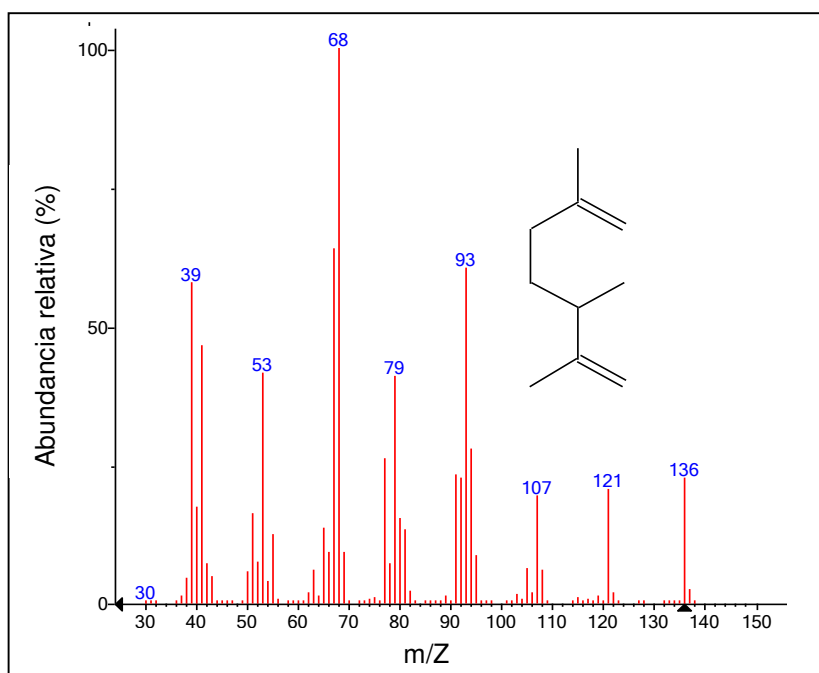


Figura 11. Espectro de la estructura D-limoneno del aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth.

4.2.2. Cromatografía de gases/espectrometría de masas de *Croton thurifer* Kunth

En el análisis por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM) del aceite esencial de *Croton thurifer* Kunth, se identificaron 35 compuestos que comprenden el 100% de la composición total del aceite esencial; en la siguiente Tabla 16 se muestra la composición química, mientras que en la Figura 12 y Anexo 9 se observa el cromatograma y en las Figuras 13-15 los espectros de los componentes con mayor porcentaje del aceite esencial.

Tabla 16. Composición química del aceite esencial de *Croton thurifer* Kunth determinado por Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas.

Nº	Nombre del compuesto	tR (min)	% en la muestra
1	α -Thuyeno	15,19	1,70
2	α -Pineno	15,64	0,96
3	Sabineno	17,74	1,20
4	β -Pineno	18,09	0,38
5	Desconocido (C ₁₀ H ₁₆)	18,57	22,38
6	α -Felandreno	19,63	3,30
7	2-metil-3-metilbutil éster del ácido Propanoico	19,92	0,99
8	p-Cimeno	20,64	0,36
9	D-Limoneno	20,93	1,94
10	β -Felandreno	21,07	1,44
11	Eucaliptol	21,16	0,51
12	1-metil-4-(1-metiletil)-1,4-ciclohexadieno	22,57	0,88
13	Copaeno	40,68	0,44
14	1-etenil-1-metil-2,4-bis(1-metiletenil)-ciclohexano	40,93	0,34
15	β -Elemeno	41,39	11,87
16	Cipereno	42,28	0,69
17	β -Cariofileno	43,08	1,95
18	Desconocido (C ₁₅ H ₂₄)	44,16	0,74
19	L-alloaromadendreno	44,44	1,25
20	α -Cariofileno	44,89	0,30
21	α -Elemeno	45,77	0,52
22	Desconocido (C ₁₅ H ₂₄)	45,88	1,43

N°	Nombre del compuesto	tR (min)	% en la muestra
23	Desconocido (C ₁₅ H ₂₄)	46,04	0,59
24	Germacreno D	46,21	10,22
25	Eremofileno	46,61	0,67
26	Desconocido (C ₁₅ H ₂₆ O)	46,85	3,73
27	Eremofileno	47,25	1,95
28	Desconocido (C ₁₅ H ₂₆ O)	47,59	1,62
29	δ-Cadineno	47,83	1,26
30	Desconocido (C ₁₅ H ₂₆ O)	52,08	0,64
31	Desconocido (C ₁₅ H ₂₂ O)	52,93	0,31
32	Desconocido (C ₉ H ₁₄ O)	53,39	1,15
33	Desconocido (C ₁₅ H ₂₆ O)	53,70	21,8
34	Desconocido (C ₁₅ H ₂₆ O)	54,20	0,28
35	Heptadecano	55,06	0,26

Legenda: (N°) número; (t_R) Tiempo de Retención

4.2.2.1. Cromatograma CG/EM del aceite esencial de *Croton thurifer* Kunth

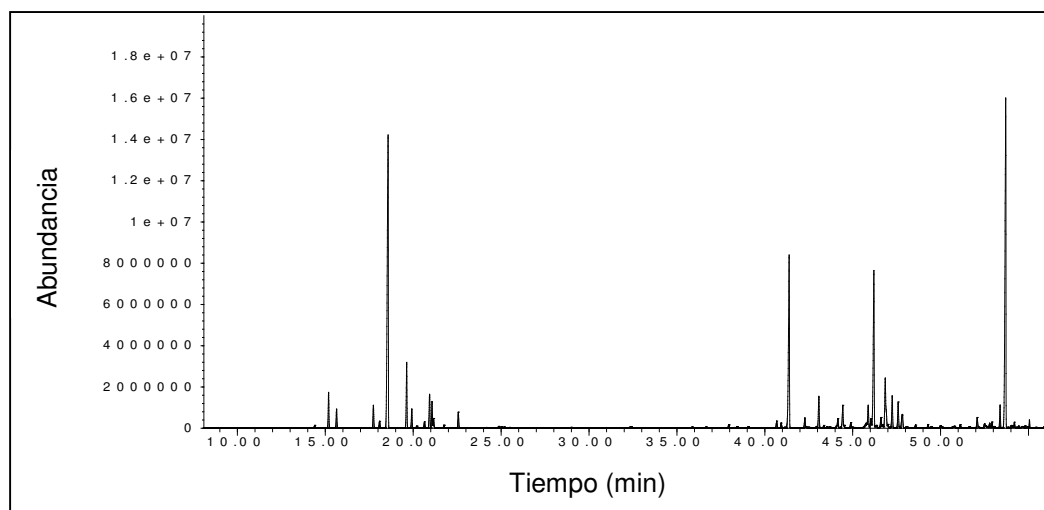


Figura 12. Cromatograma CG/EM del aceite esencial de *Croton thurifer* Kunth.

4.2.2.2. Espectros de los componentes con mayor porcentaje del aceite esencial de *Croton thurifer* Kunth

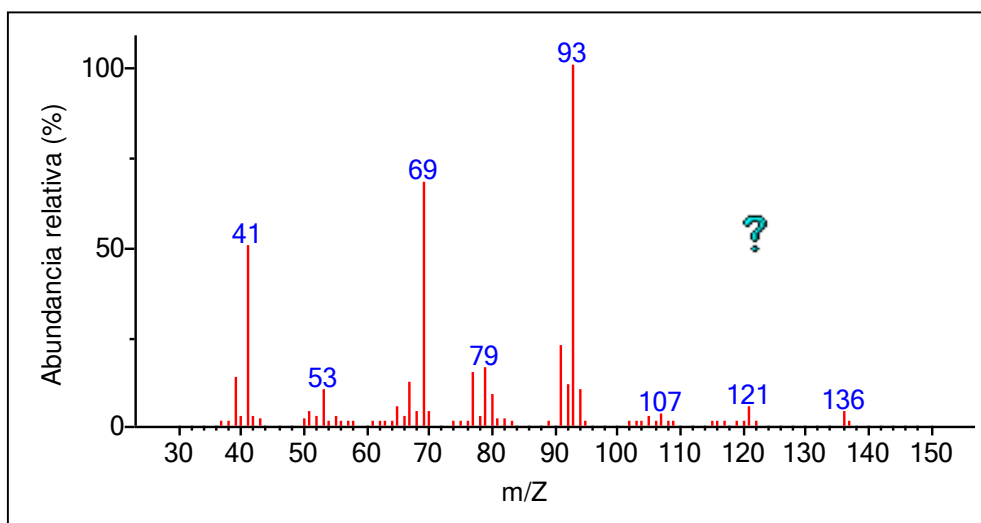


Figura 13. Espectro de compuesto desconocido (C₁₀H₁₆) del aceite esencial de *Croton thurifer* Kunth.

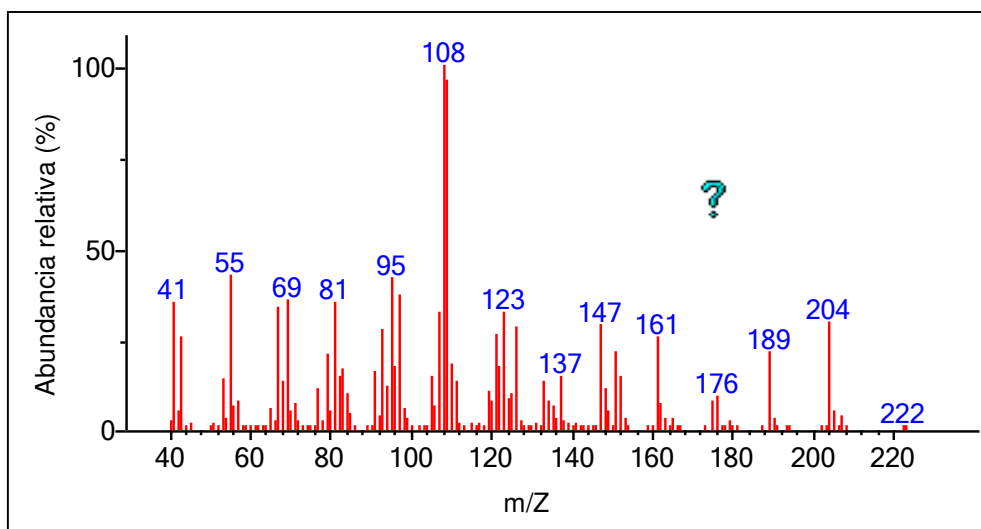


Figura 14. Espectro de compuesto desconocido (C₁₅H₂₆O) del aceite esencial de *Croton thurifer* Kunth.

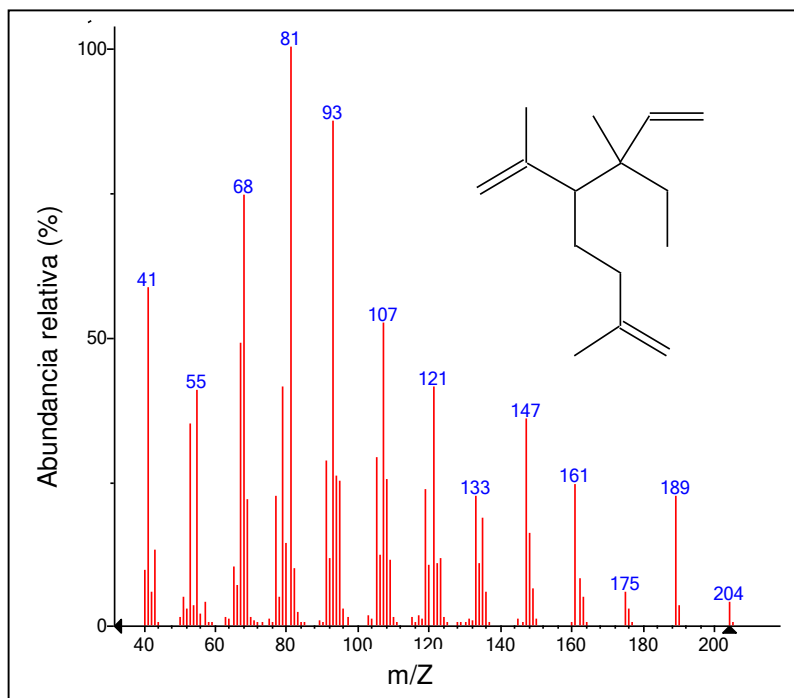


Figura 15. Espectro de la estructura β-elemeno del aceite esencial de *Croton thurifer* Kunth.

4.2.3. Cromatografía de gases/espectrometría de masas de *Croton collinus* Kunth

En el análisis por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM) del aceite esencial de *Croton collinus* Kunth, se identificaron 38 compuestos que comprenden el 100% de la composición total del aceite esencial; en la siguiente Tabla 17 se muestra la composición química, mientras que en la Figura 16 y Anexo 10 se observa el cromatograma y en las Figuras 17-19 los espectros de los componentes con mayor porcentaje del aceite esencial.

Tabla 17. Composición química del aceite esencial *Croton collinus* Kunth determinado por Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas.

N°	Nombre del compuesto	tR (min)	% en la muestra
1	α -Thuyeno	15,18	0,17
2	1R- α -Pineno	15,64	0,41
3	Sabineno	17,73	0,31
4	β -Pineno	18,08	0,36
5	β -Mirceno	18,51	6,79
6	α -Felandreno	19,61	0,61
7	p-Cimeno	20,64	0,29
8	D-Limoneno	20,96	8,73
9	β -Thuyeno	21,10	6,96
10	cis-Ocimeno	21,75	0,35
11	1-metil-4-(1-metiletil)-1,4-ciclohexadieno	22,57	2,10
12	Terpinoleno	24,16	0,17
13	2-Undecanona	35,87	0,72
14	1,5,5-Trimetil-6-metilen-ciclohexeno	38,25	0,19
15	Copaeno	40,68	0,28
16	Desconocido (C ₁₅ H ₂₄)	40,93	0,23
17	Desconocido (C ₁₅ H ₂₄)	41,13	0,23
18	β -Elemeno	41,35	6,70
19	Cipereno	42,27	1,03
20	β -Cariofileno	43,18	44,70
21	Geranil acetona	44,07	0,59
22	α -Cariofileno	44,91	3,73
23	Aromadendreno	45,10	0,23
24	Valenceno	45,74	0,53
25	α -Curcumeno	45,91	0,39
26	Germacreno D	46,15	2,51
27	α -Selineno	46,57	0,21
28	β -Cubebeno	46,70	0,22
29	Biciclogermacreno	46,87	3,88
30	Desconocido (C ₁₅ H ₂₄)	47,31	0,76
31	α -Muuroleno	47,65	0,51
32	δ -Cadineno	47,83	1,96
33	(-)-Spatulenol	50,79	0,58
34	Desconocido (C ₁₅ H ₂₄ O)	51,12	0,89
35	τ -Muuroleno	53,53	0,15

N°	Nombre del compuesto	t _R (min)	% en la muestra
36	τ -Muurolol	53,60	0,34
37	α -Cadinol	54,01	0,73
38	Heptadecano	55,05	0,49

Leyenda: (N°) número; (t_R) Tiempo de Retención

4.2.3.1. Cromatograma CG/EM del aceite esencial de *Croton collinus* Kunth

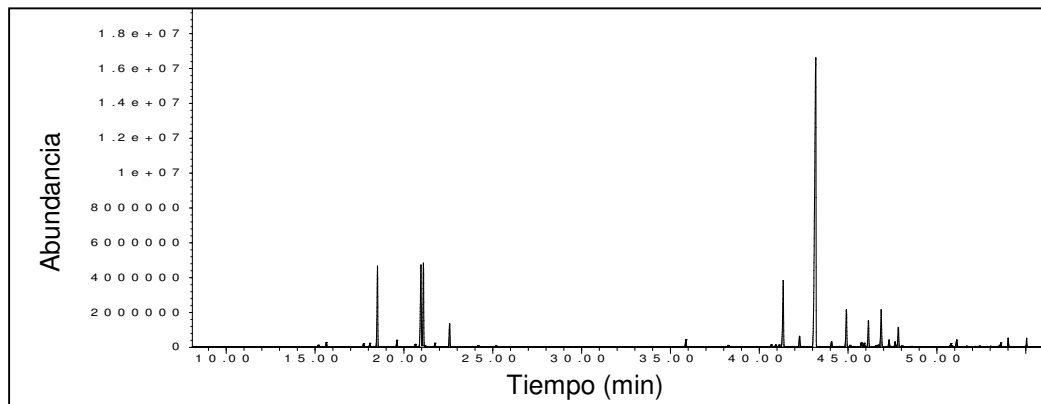


Figura 16. Cromatograma CG/EM del aceite esencial de *Croton collinus* Kunth.

4.2.3.2. Espectros de los componentes con mayor porcentaje del aceite esencial de *Croton collinus* Kunth

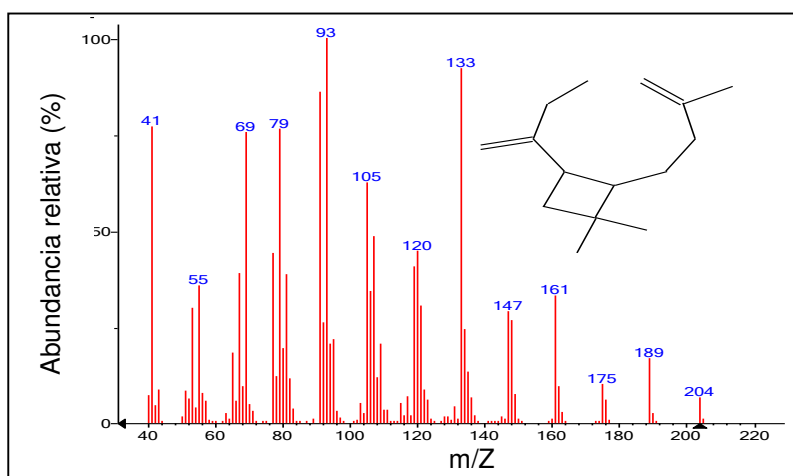


Figura 17. Espectro de la estructura β -cariofileno del aceite esencial de *Croton collinus* Kunth.

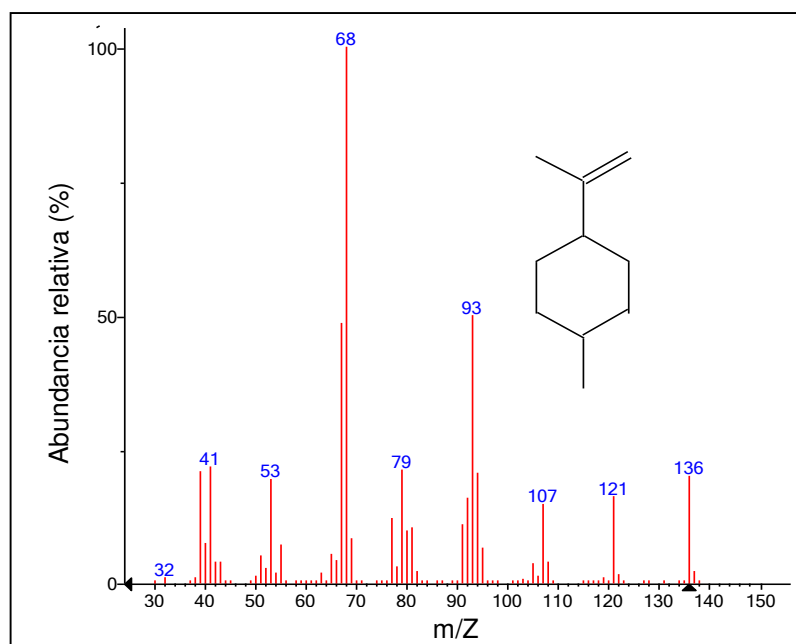


Figura 18. Espectro de la estructura D-limoneno del aceite esencial de *Croton collinus* Kunth.

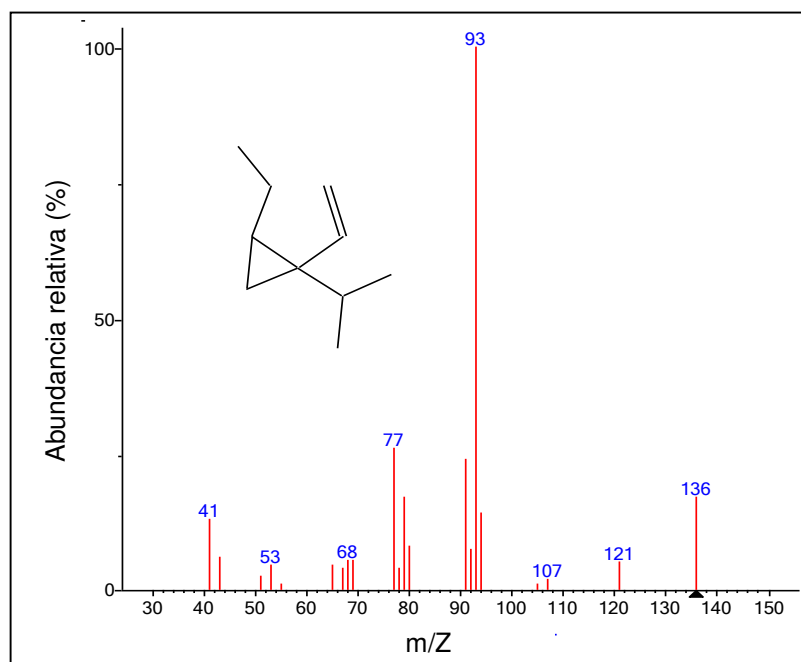


Figura 19. Espectro de la estructura β -thuyeno del aceite esencial de *Croton collinus* Kunth.

4.3. Actividad antimicrobiana

4.3.1. Método de difusión en agar

Los resultados mediante este método están expresados en las siguientes Tablas 18-22, y las Figuras 20-23.

Tabla 18. Actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar del aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth.

Microorganismo	Zona de inhibición (mm)		
	<i>Croton adipatus</i> Kunth		
	10%	50%	95%
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13,13 ± 0,44	20 ± 0	14,2 ± 0,7
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	13,1 ± 1,32	17,13 ± 0,34	25 ± 0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	14,03 ± 0,41	16 ± 0	20,03 ± 0,29
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	11,27 ± 1,02	11,53 ± 0,5	13,57 ± 0,85
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	19,67 ± 1,47	12,5 ± 0	11 ± 0

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE

Tabla 19. Actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar del aceite esencial de *Croton thurifer* Kunth.

Microorganismo	Zona de inhibición (mm)		
	<i>Croton thurifer</i> Kunth		
	10%	50%	95%
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	11,47 ± 0,5	12 ± 0	14,07 ± 0,41
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	11,5 ± 0	12,53 ± 0,46	12,17 ± 1,25
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10 ± 0	12,03 ± 0,48	11,53 ± 0,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	10 ± 0	12,5 ± 0	11 ± 0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	15,03 ± 0,38	11 ± 0	10 ± 0

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE

Tabla 20. Actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar del aceite esencial de *Croton collinus* Kunth.

Microorganismo	Zona de inhibición (mm)		
	<i>Croton collinus</i> Kunth		
	10%	50%	95%
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	10,53 ± 0,55	11,03 ± 0,52	12 ± 0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12,6 ± 0,8	14,53 ± 0,4	15 ± 0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11 ± 0	11,57 ± 0,5	10,6 ± 1,63
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	11,63 ± 1,31	12,7 ± 0,79	11,03 ± 0,52
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	15 ± 0	10,53 ± 0,55	10 ± 0

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE

Tabla 21. Actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar de los estándares Ciprofloxacino y Ketoconazol.

Microorganismo	Zona de inhibición (mm)	
	Ciprofloxacino [0,05 mg/mL]	Ketoconazol [0,2 mg/mL]
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	39 ± 0	N.A
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	52,3 ± 1,1	N.A
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15 ± 0	N.A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	34 ± 0	N.A
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	N.A	35 ± 0

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE; N.A: No aplica

Tabla 22. Cuadro comparativo de los resultados de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y los estándares mediante el método de difusión en agar.

Microorganismo		Zona de inhibición (mm)										
		Aceite esencial									Estándar	
		Croton adipatus Kunth			Croton thurifer Kunth			Croton collinus Kunth			Ciprofloxacino [0,05 mg/mL]	Ketoconazol [0,2 mg/mL]
		10%	50%	95%	10%	50%	95%	10%	50%	95%		
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13,13 ± 0,44	20 ± 0	14,2 ± 0,7	11,47 ± 0,5	12 ± 0	14,07 ± 0,41	10,53 ± 0,55	11,03 ± 0,52	12 ± 0	39 ± 0	N.A
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	13,1 ± 1,32	17,13 ± 0,34	25 ± 0	11,5 ± 0	12,53 ± 0,46	12,17 ± 1,25	12,6 ± 0,8	14,53 ± 0,4	15 ± 0	52,3 ± 1,1	N.A
Bacterias Gram (-)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	14,03 ± 0,41	16 ± 0	20,03 ± 0,29	10 ± 0	12,03 ± 0,48	11,53 ± 0,5	11 ± 0	11,57 ± 0,5	10,6 ± 1,63	15 ± 0	N.A
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	11,27 ± 1,02	11,53 ± 0,5	13,57 ± 0,85	10 ± 0	12,5 ± 0	11 ± 0	11,63 ± 1,31	12,7 ± 0,79	11,03 ± 0,52	34 ± 0	N.A
Levadura	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	19,67 ± 1,47	12,5 ± 0	11 ± 0	15,03 ± 0,38	11 ± 0	10 ± 0	15 ± 0	10,53 ± 0,55	10 ± 0	N.A	35 ± 0

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE; N.A: No aplica

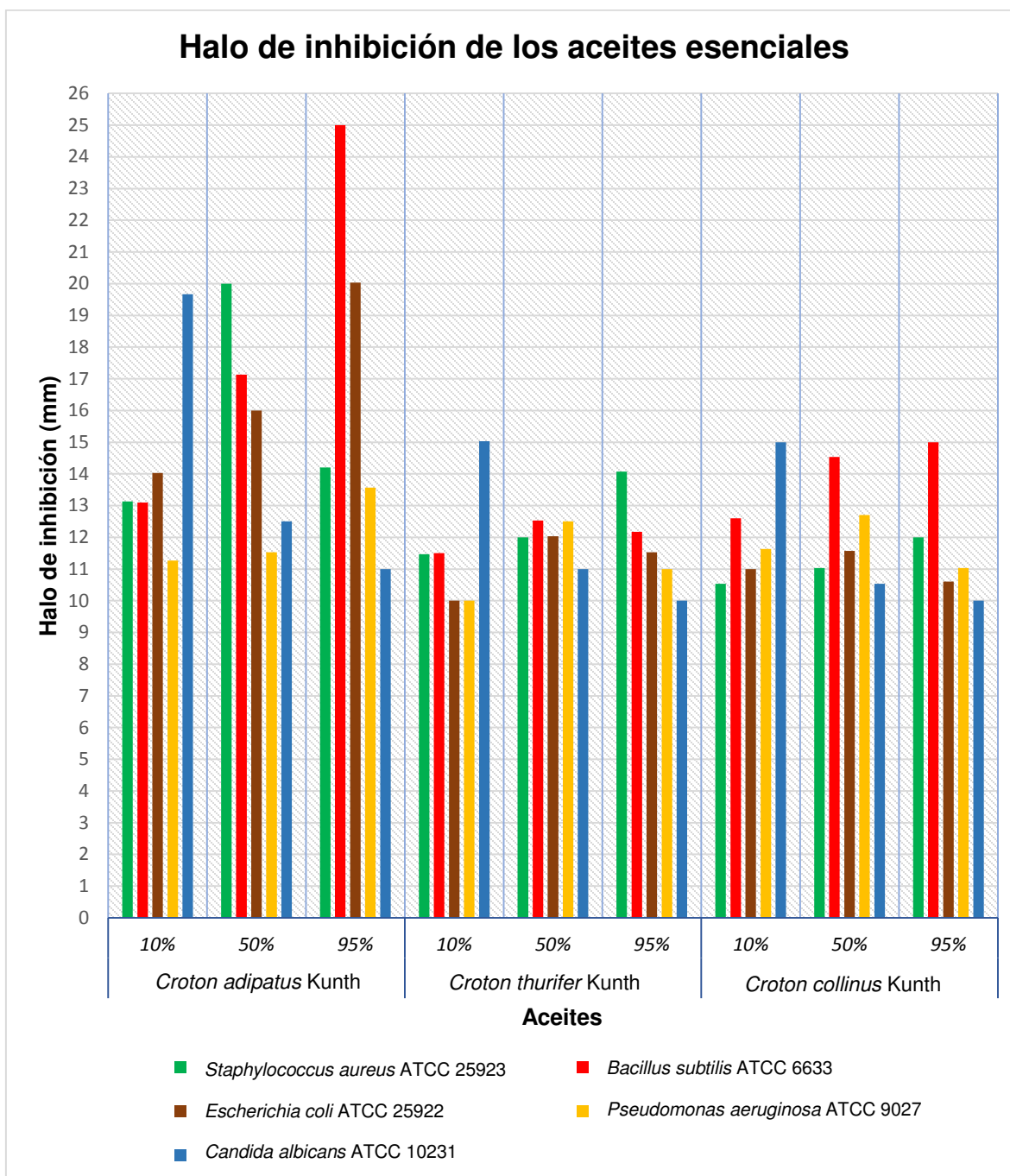


Figura 20. Gráfico comparativo de los resultados de la determinación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales a tres concentraciones (10%, 50%, 95%) por el Método de Difusión en Agar.

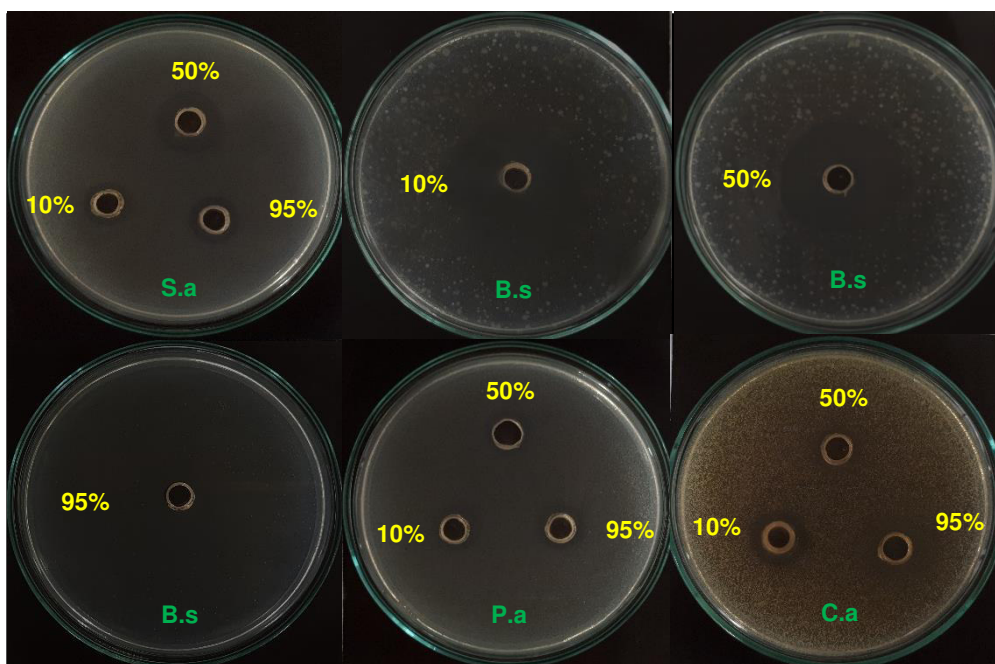


Figura 21. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth en las diferentes concentraciones 10%, 50% y 95% por el método de difusión en agar contra los microorganismos mencionados en la leyenda.

Leyenda: La sigla de color verde representa los microorganismos como S.a (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), B.s (*Bacillus subtilis* ATCC 6633), P.a (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) y C.a (*Candida albicans* ATCC 10231); mientras que los números de color amarillo representan los porcentajes de la especie vegetal 10% (concentración del aceite esencial al 10%), 50% (concentración del aceite esencial al 50%) y 95% (concentración del aceite esencial al 95%).

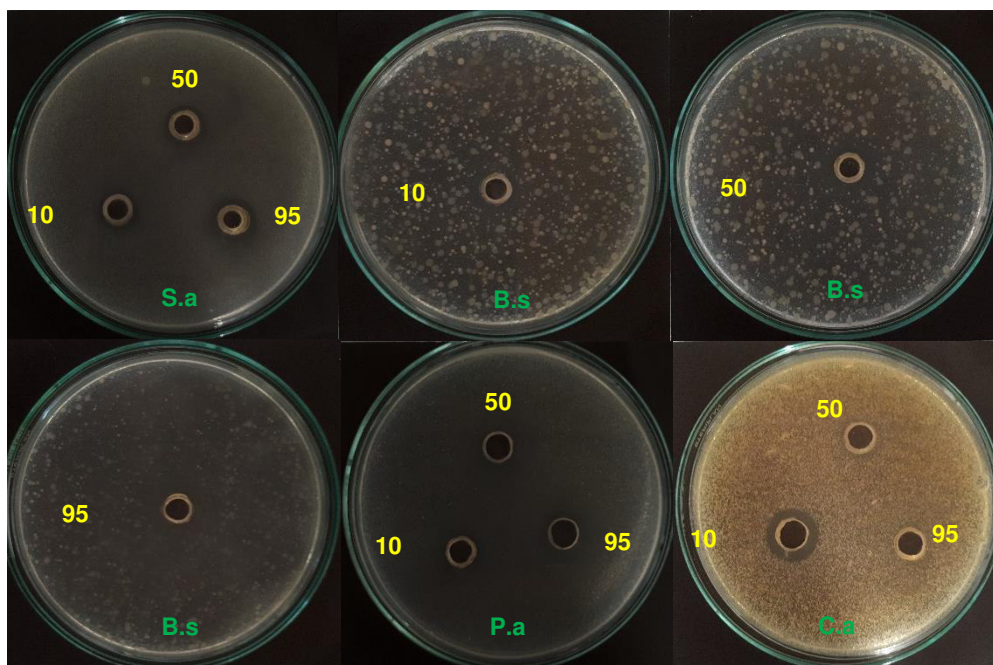


Figura 22. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Croton thurifer* Kunth en las diferentes concentraciones 10%, 50% y 95% por el método de difusión en agar contra los microorganismos mencionados en la leyenda.

Leyenda: La sigla de color verde representa los microorganismos como S.a (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), B.s (*Bacillus subtilis* ATCC 6633), P.a (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) y C.a (*Candida albicans* ATCC 10231); mientras que los números de color amarillo representan los porcentajes de la especie vegetal 10% (concentración del aceite esencial al 10%), 50% (concentración del aceite esencial al 50%) y 95% (concentración del aceite esencial al 95%).

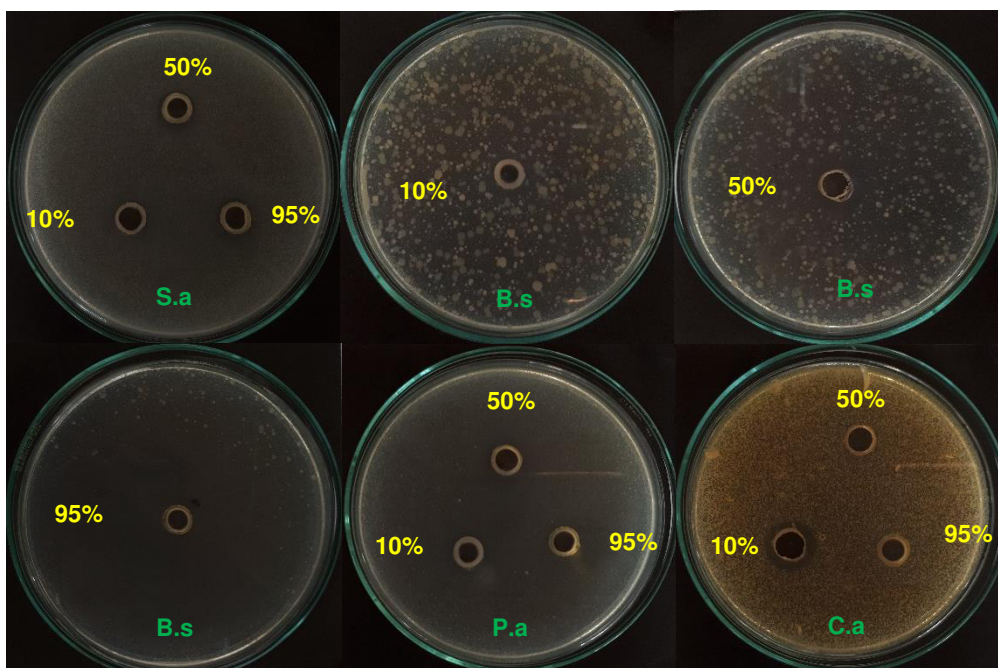


Figura 23. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Croton collinus* Kunth en las diferentes concentraciones 10%, 50% y 95% por el método de difusión en agar contra los microorganismos mencionados en la leyenda.

Leyenda: La sigla de color verde representa los microorganismos como S.a (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), B.s (*Bacillus subtilis* ATCC 6633), P.a (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027) y C.a (*Candida albicans* ATCC 10231); mientras que los números de color amarillo representan los porcentajes de la especie vegetal 10% (concentración del aceite esencial al 10%), 50% (concentración del aceite esencial al 50%) y 95% (concentración del aceite esencial al 95%).

4.3.2. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de microdilución colorimétrica en microplaca

Los resultados de la concentración mínima inhibitoria por el método de microdilución colorimétrica de los aceites esenciales en estudio se presentan las siguientes Tablas 23-25 y las Figuras 24-28.

Tabla 23. Valores de la Concentración Mínima Inhibitoria de los tres aceites esenciales contra cinco microorganismos.

Microorganismo	Concentración Mínima Inhibitoria (μL/mL)		
	<i>Croton adipatus</i> Kunth	<i>Croton thurifer</i> Kunth	<i>Croton collinus</i> Kunth
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2,5 ± 0	0,31 ± 0	5 ± 0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,31 ± 0	0,16 ± 0	0,08 ± 0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,5 ± 0	≥ 40	≥ 40
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	≥ 40	≥ 40	≥ 40
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,63 ± 0	1,25 ± 0	0,63 ± 0

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE.

Tabla 24. Valores de la Concentración Mínima Inhibitoria de los controles Ciprofloxacino y Ketoconazol contra cinco microorganismos.

Microorganismo	Concentración Mínima Inhibitoria (μg/mL)	
	Ciprofloxacino	Ketoconazol
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,5 ± 0	N.A
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,13 ± 0	N.A
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	4 ± 0	N.A
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	32 ± 0	N.A
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	N.A	0,03 ± 0

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE, N.A: No aplica.

Tabla 25. Cuadro comparativo de resultados obtenidos de la Concentración Mínima Inhibitoria de los tres aceites esenciales y los estándares mediante el método de microdilución colorimétrica.

Microorganismo		Concentración Mínima Inhibitoria				
		Aceite esencial (µL/mL)			Estándar (µg/mL)	
		<i>Croton adipatus</i> Kunth	<i>Croton thurifer</i> Kunth	<i>Croton collinus</i> Kunth	Ciprofloxacino	Ketoconazol
Bacterias Gram (+)	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	2,5 ± 0	0,31 ± 0	5 ± 0	0,5 ± 0	N.A
	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0,31 ± 0	0,16 ± 0	0,08 ± 0	0,13 ± 0	N.A
Bacterias Gram (-)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,5 ± 0	≥ 40	≥ 40	4 ± 0	N.A
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	≥ 40	≥ 40	≥ 40	32 ± 0	N.A
Levadura	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	0,63 ± 0	1,25 ± 0	0,63 ± 0	N.A	0,03 ± 0

Leyenda: Los resultados están expresados en Prom. ± DE, N.A: No aplica.

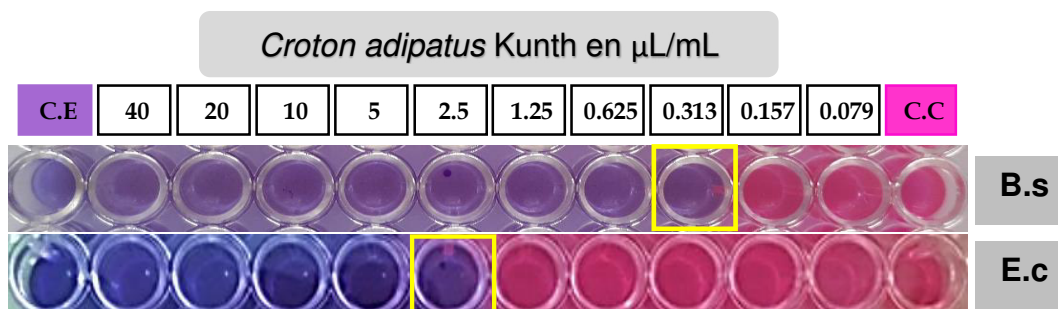


Figura 24. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth contra los microorganismos.

Leyenda: C.E (Control de esterilidad), C.C (Control de crecimiento), B.s (*Bacillus subtilis* ATCC 6633), E.c (*Escherichia coli* ATCC 25922), P.a (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027).

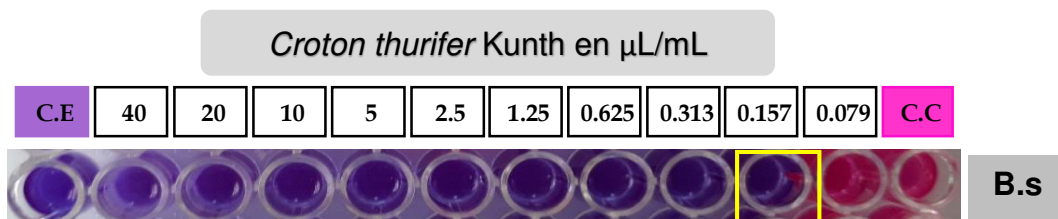


Figura 25. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Croton thurifer* Kunth contra los microorganismos.

Leyenda: C.E (Control de esterilidad), C.C (Control de crecimiento), B.s (*Bacillus subtilis* ATCC 6633).

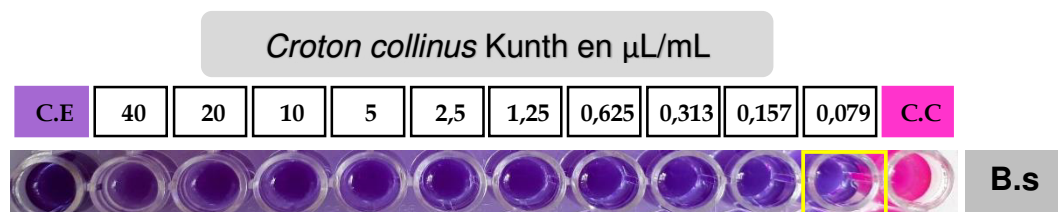


Figura 26. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Croton collinus* Kunth contra los microorganismos.

Leyenda: C.E (Control de esterilidad), C.C (Control de crecimiento), B.s (*Bacillus subtilis* ATCC 6633).

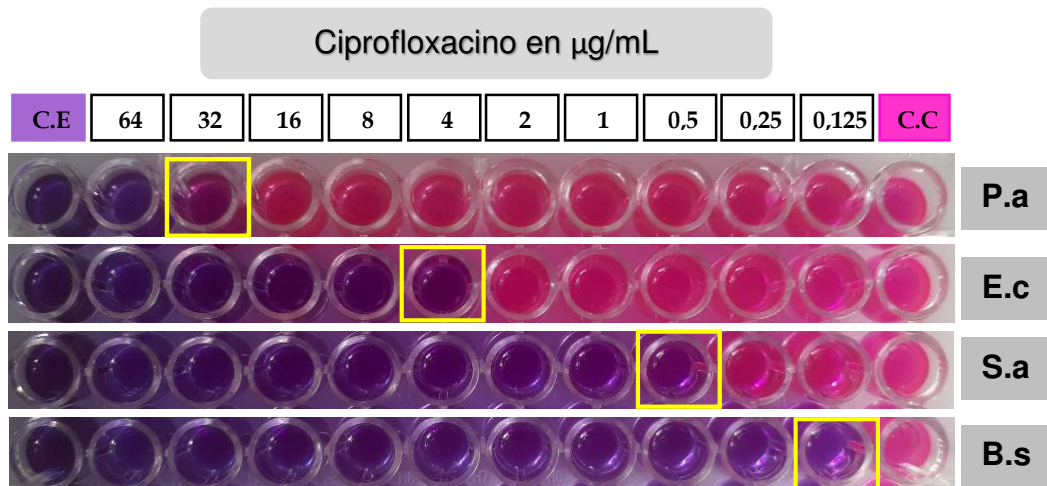


Figura 27. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del estándar Ciprofloxacino contra cuatro microorganismos.

Leyenda: C.E (Control de esterilidad), C.C (Control de crecimiento), S.a (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923), B.s (*Bacillus subtilis* ATCC 6633), E.c (*Escherichia coli* ATCC 25922), P.a (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027).

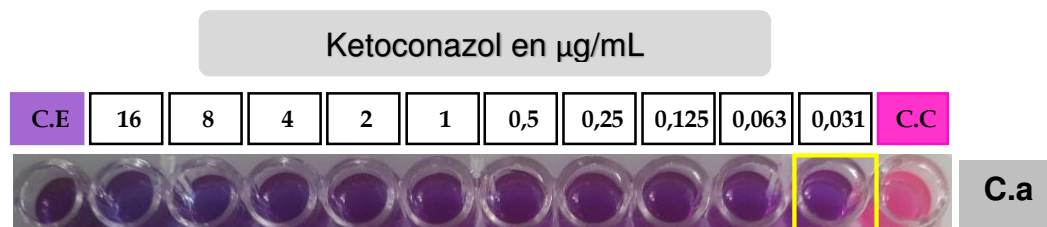


Figura 28. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del estándar Ketoconazol contra *Candida albicans* ATCC 10231.

Leyenda: C.E (Control de esterilidad), C.C (Control de crecimiento), C.a (*Candida albicans* ATCC 10231).

4.4. Actividad antioxidante por el método DPPH (1,1-difenil-2-2-picril-hidrazilo)

La actividad antioxidante de los aceites esenciales de *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth se determinaron con el ensayo del radical DPPH. Los resultados están expresados en las siguientes Tablas 26-30 y Figuras 29-33.

Tabla 26. Porcentaje de inhibición de radicales libres por el método DPPH para el aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth.

Aceite esencial <i>Croton adipatus</i> Kunth	
Concentración (mg/mL)	DPPH (% Inhibición)
0,9	14,13 (a)*
3,0	34,44 (b)*
9,1	50,88 (c)*
18,1	86,68 (d)*
22,7	91,68 (e)*
IC ₅₀ (mg/mL): 9,16	

Leyenda: IC₅₀: concentración eficiente o requerida para obtener un cincuenta por ciento del efecto antioxidante. *Las letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. (P≤0,05)

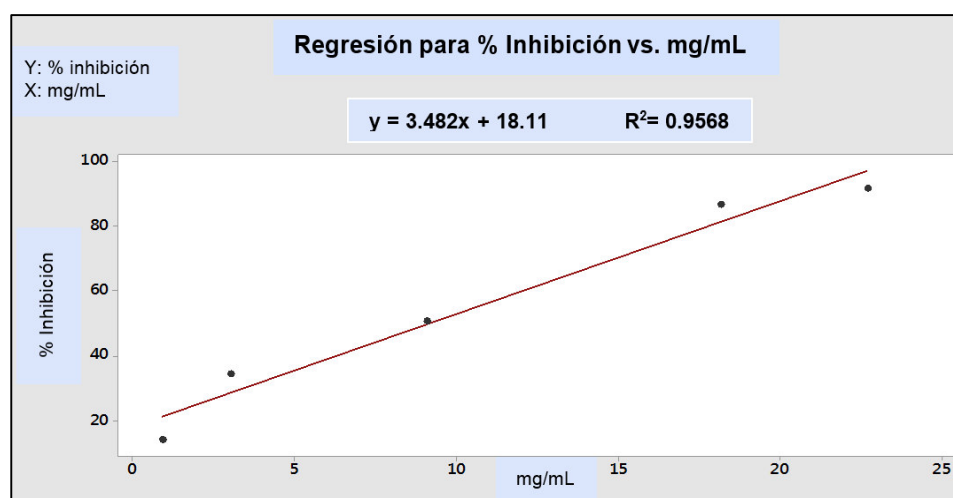


Figura 29. Correlación entre las concentraciones del aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth vs el porcentaje de inhibición del radical DPPH.

Tabla 27. Porcentaje de inhibición de radicales libres por el método DPPH para el aceite esencial de *Croton thurifer* Kunth.

Aceite esencial <i>Croton thurifer</i> Kunth	
Concentración (mg/mL)	DPPH (% Inhibición)
0,9	2,20 (a)*
3,0	11,92 (b)*
9,1	55,66 (c)*
18,2	95,21 (d)*
IC ₅₀ (mg/mL) : 9,42	

Leyenda: IC₅₀: concentración eficiente o requerida para obtener un cincuenta por ciento del efecto antioxidante. *Las letras distintas en la columna indican diferencias estadísticamente significativas usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. (P≤0,05)

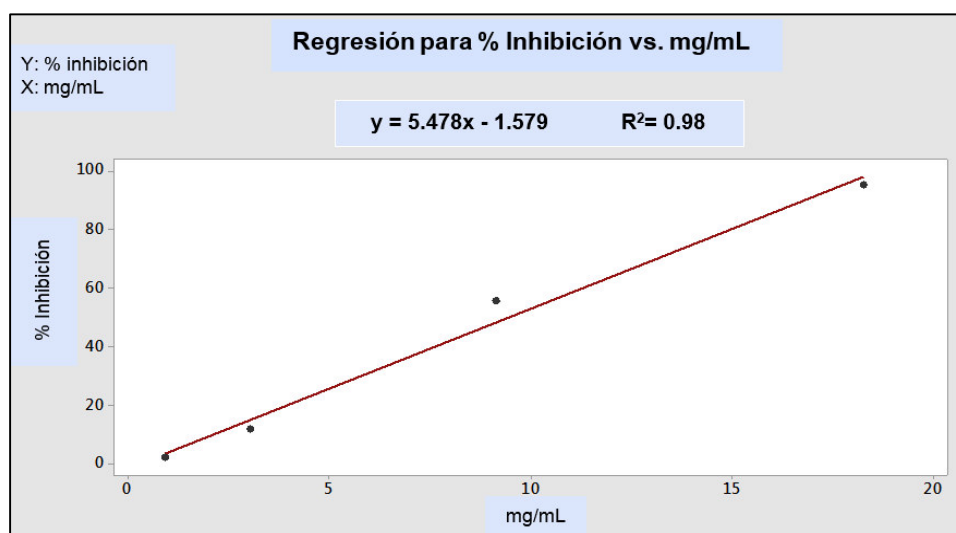


Figura 30. Correlación entre las concentraciones del aceite esencial de *Croton thurifer* Kunth vs el porcentaje de inhibición del radical DPPH.

Tabla 28. Porcentaje de inhibición de radicales libres por el método DPPH para el aceite esencial de *Croton collinus* Kunth.

Aceite esencial <i>Croton collinus</i> Kunth	
Concentración (mg/mL)	DPPH (% Inhibición)
0,3	3,7 (a)*
0,9	9,52 (b)*
3,1	26,23 (c)*
9,4	49,63 (d)*
18,7	80,23 (e)*
23,4	84,47 (f)*
IC₅₀ (mg/mL): 11,51	

Leyenda: IC₅₀: concentración eficiente o requerida para obtener un cincuenta por ciento del efecto antioxidante. *Las letras distintas en la columna indica diferencias estadísticamente significativas usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. (P≤0,05)

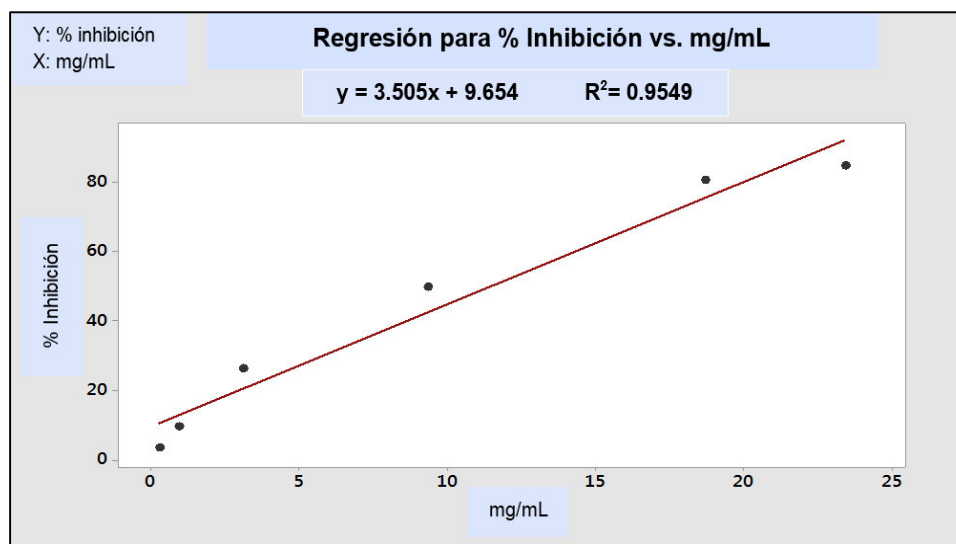


Figura 31. Correlación entre las concentraciones del aceite esencial de *Croton collinus* Kunth vs el porcentaje de inhibición del radical DPPH.

Tabla 29. Porcentaje de inhibición de radicales libres por el método DPPH para el estándar Vitamina C.

Estándar Vitamina C	
Concentración (µg/mL)	DPPH (% Inhibición)
0,83	12,57 (a)*
1,67	28,13 (b)*
2,50	52,13 (c)*
3,33	77,93 (d)*
IC₅₀ (µg/mL): 2,36	

Leyenda: IC₅₀: concentración eficiente o requerida para obtener un cincuenta por ciento del efecto antioxidante. *Las letras distintas en la columna indica diferencias estadísticamente significativas usando el método de Tukey con un nivel de confianza al 95%. (P≤0,05)

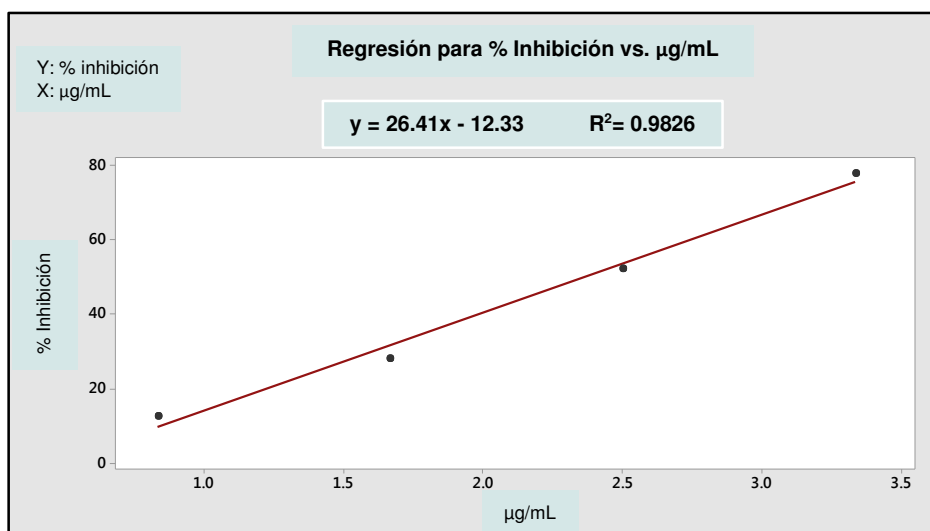


Figura 32. Correlación entre las concentraciones del estándar Vitamina C vs el porcentaje de inhibición del radical DPPH.

Tabla 30. Cuadro comparativo de los tres aceites esenciales y el estándar Vitamina C.

	Aceite esencial			Estándar
	<i>Croton adipatus</i> Kunth	<i>Croton thurifer</i> Kunth	<i>Croton collinus</i> Kunth	Vitamina C
IC₅₀	9,16 mg/mL	9,42 mg/mL	11,51 mg/mL	2,36 µg/mL

Leyenda: IC₅₀: concentración eficiente o requerida para obtener un cincuenta por ciento del efecto antioxidante.

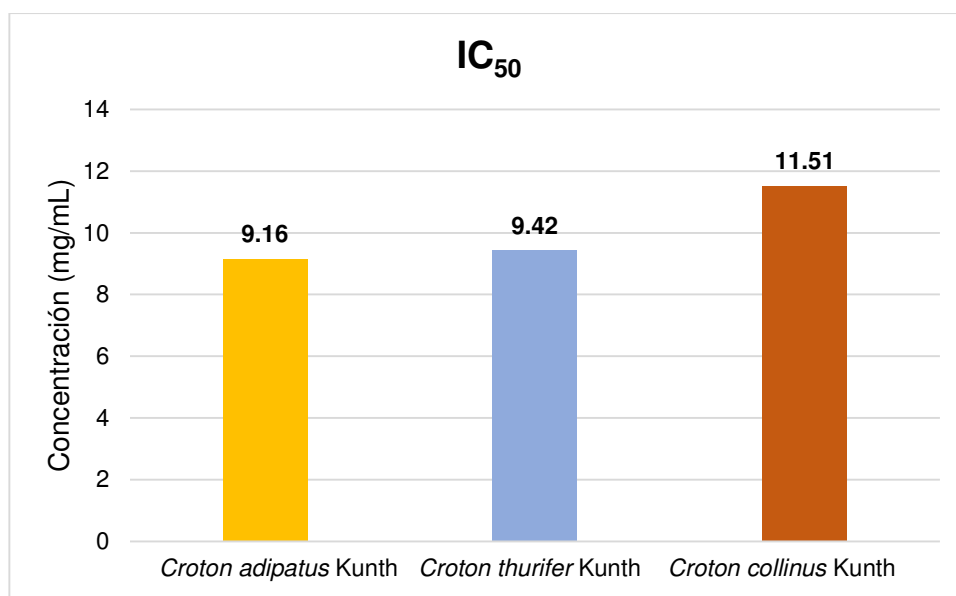


Figura 33. Comparativo IC₅₀ de los tres aceites esenciales.

V. DISCUSIÓN

El rendimiento de la extracción de los aceites esenciales por hidrodestilación de las hojas secas de *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth fue de 0,47%, 0,07% y 0,06%, respectivamente; siendo estos los primeros reportes de las especies vegetales. Otros estudios del género *Croton* reportaron rendimientos de 0,02% a 1,8% tales como *Croton campestris* (ramas: 0,02%; hojas: 0,04%)¹³, *Croton hieronymi* Griseb (raíces: 0,06%; hojas: 0,07%)²², *Croton zambesicus* (tallo con hojas: 0,28%)¹⁴, *Croton malambo* H.Karst (corteza: 0,4%)⁸⁶, *Croton cajucara* Benth (hojas: 0,4% y 0,65%)^{15,24}, *Croton heterocalyx* Baill (hojas: 0,45%)²⁰, *Croton pullei* (tallos: 0,06%, hojas: 0,5%)²⁵, *Croton blanchetianus* Baill (hojas: 0,7%)¹⁹, *Croton oblongifolius* Roxb (corteza: 0,9%)²³, *Croton borarium* (hojas: 0,68%)²⁶, *Croton geayi* (hojas: 0,72%)²⁶, *Croton greveanus* (hojas: 0,96%)²⁶ y *Croton zehntneri* (hojas: 1,8%)¹⁸.

En el presente estudio, *Croton adipatus* Kunth presentó el mayor rendimiento en la extracción, el cual se encuentra dentro del promedio reportado en otras especies del mismo género. Factores como la composición del suelo, clima, localización geográfica, variedad de la especie, estado vegetativo, variación estacional, órgano empleado para la extracción, periodo de recolección, almacenamiento, métodos de secado, procesos de extracción^{87,88}, entre otros; son determinantes en la composición, proporción y cantidad en los aceites esenciales.

Respecto a la elucidación estructural mediante el método de Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del aceite esencial de ***Croton adipatus* Kunth**, se determinaron 46 compuestos (Tabla 15). Se obtuvo predominantemente monoterpenos 72,73% (monoterpenos hidrocarbonados 69,76%; monoterpenos oxigenados 2,97%), seguido por sesquiterpenos 18,82% (sesquiterpenos hidrocarbonados 16,06%; sesquiterpenos oxigenados 2,76%), derivados de fenilpropano 0,24% y otros 8,21%. β -mirceno fue el mayor componente encontrado con 18,34%, seguido por α -thuyeno 12,69%, D-limoneno 10,94%, α -felandreno 8,19% y β -elemeno 6,47%. Estos resultados son

el primer reporte de la composición química, siendo las concentraciones de β -mirceno (18,34%) y α -thuyeno (12,69%) las más altas encontradas respecto a las especies del género *Croton*. También se encontró una concentración similar de D-limoneno (10,94%), respecto a lo reportado por De Almeida y col. para *Croton campestris* (9,7%)¹³, y una concentración menor a lo reportado por Fatiany y col. para *Croton geayi* (22,92%)²⁶.

Para el aceite esencial de ***Croton thurifer* Kunth**, se determinaron 35 compuestos (Tabla 16). Se obtuvo predominantemente sesquiterpenos 62,26% (sesquiterpenos hidrocarbonados 33,88%; sesquiterpenos oxigenados 28,38%), seguido por los monoterpenos 35,39% (monoterpenos hidrocarbonados 34,88%; monoterpenos oxigenados 0,51%) y otros 2,35%. El componente monoterpénico desconocido con 22,38% ($C_{10}H_{16}$; t_R : 18,57) fue el mayor componente encontrado, seguido por otro componente sesquiterpénico desconocido 21,8% ($C_{15}H_{26}O$; t_R : 53,7), β -elemeno 11,87%, germacreno D 10,22%. Estos resultados son el primer reporte de la composición química. Moreno y col. reportaron para las hojas de *Croton heterocalyx* Baill (β -elemeno 8,2%)²⁰ y De Araújo reportó para los tallos de *Croton rhamnifolius* var. *heliotropiifolius* (Kunth) Müll. Arg (17,28%)⁸⁹. Por otro lado se reportaron para las hojas lo siguiente Moreno y col. en *Croton heterocalyx* Baill (germacreno D 12,5%)²⁰, Dai y col. en *Croton cascarilloides* (6,0%)⁹⁰, Turiel y col. en *Croton draconoides* Müll. Arg. (9,0%)⁹¹, Vunda y col. en *Croton isabelli* (12,6%)⁹² y Rojas y col. en *Croton huberi* Steyererm (16,1%)⁹³.

Mientras que en el aceite esencial de ***Croton collinus* Kunth**, se determinaron 38 compuestos (Tabla 17). Se obtuvo predominantemente sesquiterpenos 70,26% (sesquiterpenos hidrocarbonados 68,25%; sesquiterpenos oxigenados 2,51%), seguido por los monoterpenos 28,03% (monoterpenos hidrocarbonados 27,44%; monoterpenos oxigenados 0,59%) y otros 1,21%. El componente mayoritario fue β -cariofileno con 44,7%, seguido por D-limoneno 8,73%, β -thuyeno 6,96%, β -mirceno 6,79% y β -elemeno 6,7%. Estos resultados son el primer reporte de la composición química, siendo la concentración de β -

cariofileno (44,7%) la más alta encontrada respecto a las especies del género *Croton*. Por otro lado otros autores reportaron diversas concentraciones menores de este componente (β -cariofileno): para las hojas Radulović y col. en *Croton antanosiensis* Leandri (28,23%)⁹⁴ y en *Croton decaryi* Leandri (26,65%)⁹⁴, De Araújo y col. en *Croton rhamnifolius* var. *heliotropiifolius* (Kunth) Müll.Arg (20,82%)⁸⁹, Rojas y col. en *Croton huberi* Steyerm. (18,3%)⁹³, De Almeida y col. en *Croton campestris* (17,0%)¹³, Jaramillo y col. en *Croton trinitatis* (15,3%)⁹⁵, Vunda y col. en *Croton isabelli* (14,3%)⁹², Dai y col. en *Croton cascarilloides* Raeusch (13,5%)⁹⁰, Vunda y col. en *Croton pallidulus* (11,5%)⁹², Dai y col. en *Croton tonkinensis* Gagnep (10,1%)⁹⁰, Vunda y col. en *Croton ericoides* (8,1%)⁹², Turiel y col. en *Croton urucurana* Baill (7,9%)⁹¹, mientras en las ramas De Almeida y col. reportó en *Croton campestris* (8,2%)¹³.

Otros estudios del género *Croton* reportaron diferentes compuestos mayoritarios según el órgano de la planta del cual se realizó la extracción. En tallos con hojas de *Croton zambesicus* (1,8-cineol 27,07% y cimeno 13,80%)¹⁴; en las hojas de *Croton zehntneri* (estragol 93,61% y 84,7%)¹⁸, mientras que en los tallos (estragol 72,64% y trans-anetol 23,32%)¹⁶; en las hojas de *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffman (espatulenol 22,46% y 1,8-cineol 18,32%)²¹; en las hojas de *Croton hieronymi* Griseb (alcanfor 13,9%)²², mientras que en la raíz (γ -asarona 25,7%)²²; en el corteza de *Croton oblongifolius* Roxb (terpinen-4-ol 17,8%)²³; en las hojas de *Croton pullei* (linalol 24,9%)²⁵, mientras que en el tallo (linalol 39,72%)²⁵; en las hojas de *Croton greveanus* (1, 8 cineol 40,40% y linalol 23,81%)²⁶; en las hojas de *Croton borarium* (β -felandreno 39,72% y α -terpineol 25,12%)²⁶; en las hojas de *Croton geayi* (β -pineno 28,74% y limoneno 22,92%)²⁶; en la corteza de *Croton malambo* H.Karst (metileugenol 68,4%)⁸⁶, entre otros⁹⁶⁻¹⁰¹.

La diversidad de las características cualitativas y cuantitativas de los componentes de los aceites esenciales en las especies estudiadas *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth puede explicarse debido a muchos factores reportados por otros autores tales como época estacional de recolección^{56,88,102,103}, método de extracción^{88,103}, método de

secado^{88,102}, tiempo de secado¹⁰², condiciones geográficas^{6,56,102}, variabilidad genética^{6,56}, composición del suelo¹¹, órgano de la planta^{11,103}, clima¹¹, condición de sequía¹⁰², ciclo de estado vegetativo¹¹, nutrición de la planta⁶, aplicación de fertilizantes⁶, estrés durante el crecimiento⁶ y almacenamiento post recolección⁶.

Respecto a la actividad antimicrobiana del aceite esencial de ***Croton adipatus Kunth*** por el **método de difusión en agar**, presentó actividad significativa frente a las bacterias Gram positivas, una Gram negativa y la levadura del presente estudio (ver Tabla 18). El aceite esencial a una concentración de 50% inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($20,0 \pm 0$ mm), mientras que una concentración de 95% inhibió el crecimiento de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ($25,0 \pm 0$ mm) y *Escherichia coli* ATCC 25922 ($20,03 \pm 0,29$ mm). Para la concentración al 10% del aceite esencial se observó inhibición de *Candida albicans* ATCC 10231 ($19,67 \pm 1,47$ mm). Por otro lado no se observó actividad significativa contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

En los resultados de la prueba para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de ***Croton thurifer Kunth*** (concentración 10%, 50% y 95%) por el método de difusión en agar, presentó halos de inhibición entre 11 y 14 mm para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Para la concentración al 10% del aceite esencial se observó la formación del halo ($15,03 \pm 0,38$ mm) respecto a la *Candida albicans* ATCC 10231 (ver Tabla 19).

En relación a los resultados de la prueba para evaluar la actividad antimicrobiana del aceite esencial de ***Croton collinus Kunth*** (concentración 10%, 50% y 95%) por el método de difusión en agar, presentó halos de inhibición entre 11 y 15 mm para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Candida albicans* ATCC 10231. (ver Tabla 20).

En otros estudios del género *Croton* respecto a la actividad antimicrobiana (método de difusión) para los siguientes microorganismos se reportó lo siguiente:

Para ***Staphylococcus aureus***, Fatiany y col. en las hojas de *Croton borarium* reportaron inhibición de 22,5 mm²⁶ y Lawal y col. en las hojas de *Croton gratissimus* (21,6 mm)¹⁰⁴ lo cual representa actividad significativa. Resultados similares se obtuvieron en el presente estudio para las hojas de *Croton adipatus* Kunth (20,0 mm). Por otro lado otros autores reportaron que los aceites esenciales de las siguientes especies vegetales no tuvieron buena actividad: hojas y tallos de *Croton zehntneri*^{16,18} y en las hojas de *Croton geayi* y *Croton greveanus*²⁶; así como *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth del presente estudio.

Bacillus subtilis, Andrade y col. en las hojas y tallos de *Croton zehntneri*¹⁸, Fatiany y col. en las hojas de *Croton borarium*, *Croton geayi* y *Croton greveanus*²⁶ reportaron que sus aceites esenciales no obtuvieron actividad significativa. Similares resultados se evidenciaron para *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth. Sin embargo *Croton adipatus* Kunth mostró inhibición de 25,0 mm.

Escherichia coli, Lawal y col. en las hojas de *Croton gratissimus* reportaron inhibición de 23,0 mm¹⁰⁴, resultados similares se obtuvieron para *Croton adipatus* Kunth (20,03 mm). Por otro lado otros autores reportaron que los aceites esenciales de las siguientes especies vegetales no tuvieron buena actividad: hojas y tallos de *Croton zehntneri*^{16,18}, raíces y hojas de *Croton hieronymi* Griseb²², hojas de *Croton borarium*, *Croton geayi* y *Croton greveanus*²⁶; del mismo modo se observó para *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth del presente estudio.

Pseudomonas aeruginosa, Fatiany y col. en las hojas de *Croton borarium* reportaron inhibición de 18,3 mm²⁶. En contraposición, *Croton zehntneri* (hojas y tallos)^{16,18}, *Croton geayi* (hojas)²⁶, *Croton greveanus* (hojas)²⁶ y *Croton gratissimus* (hojas)¹⁰⁴ no presentaron buena actividad; del mismo modo se evidenció para las tres especies trabajadas en el presente estudio.

Para ***Candida albicans***, las siguientes especies vegetales no tuvieron actividad significativa en hojas y tallos de *Croton zehntneri*¹⁸, en raíces y hojas de *Croton*

hieronymi Griseb²², en hojas de *Croton borarium*²⁶, *Croton geayi*²⁶, *Croton greveanus*²⁶ y *Croton cajucara* Benth²⁴; similares resultados se obtuvieron para *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth. Por el contrario en el presente estudio *Croton adipatus* Kunth reportó inhibición de 19,67 mm.

Resultados para este tipo de prueba antimicrobiana preliminar presentaron cierto grado de variabilidad, que podrían ser explicados por distintos factores que influyen como solubilidad de los aceites esenciales en el medio a difundir, polaridad del aceite esencial, tamaño molecular de los componentes que comprende el aceite esencial entre otros; por lo tanto no necesariamente tendrían correlación frente a los resultados de otras pruebas más específicas tales como microdilución o dilución en caldo.

Por el **método de microdilución colorimétrica**, el aceite esencial de ***Croton adipatus* Kunth** presentó actividad moderada frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ($0,31 \pm 0 \mu\text{L/mL}$ / $281 \mu\text{g/mL}$) y actividad débil frente a *Candida albicans* ATCC 10231 ($0,63 \pm 0 \mu\text{L/mL}$ / $571 \mu\text{g/mL}$). No presentó actividad contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($2,5 \pm 0 \mu\text{L/mL}$), *Escherichia coli* ATCC 25922 ($2,5 \pm 0 \mu\text{L/mL}$) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ($\geq 40 \pm 0 \mu\text{L/mL}$). (ver Tabla 23)

El aceite esencial de ***Croton thurifer* Kunth**, presentó actividad moderada frente a las siguientes bacterias *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($0,31 \pm 0 \mu\text{L/mL}$ / $291 \mu\text{g/mL}$) y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ($0,16 \pm 0 \mu\text{L/mL}$ / $150 \mu\text{g/mL}$). No presentó actividad contra *Escherichia coli* ATCC 25922 ($\geq 40 \pm 0 \mu\text{L/mL}$) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ($\geq 40 \pm 0 \mu\text{L/mL}$) y la levadura *Candida albicans* ATCC 10231 ($1,25 \pm 0 \mu\text{L/mL}$). (ver Tabla 23)

El aceite esencial de ***Croton collinus* Kunth** presentó buena actividad frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ($0,08 \pm 0 \mu\text{L/mL}$ / $73 \mu\text{g/mL}$) y actividad débil frente a *Candida albicans* ATCC 10231 ($1,25 \pm 0 \mu\text{L/mL}$ / $574 \mu\text{g/mL}$). No presentó actividad contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($5,0 \pm 0 \mu\text{L/mL}$),

Escherichia coli ATCC 25922 ($\geq 40 \pm 0 \mu\text{L/mL}$) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 ($\geq 40 \pm 0 \mu\text{L/mL}$). (ver Tabla 23)

En otros estudios del género *Croton* respecto a la actividad antimicrobiana (microdilución colorimétrica) se reportó lo siguiente:

Para ***Staphylococcus aureus*** se evidenció actividad representativa en las investigaciones de Yagi y col. en las partes aéreas de *Croton zambesicus* ($16 \mu\text{g/mL}$)¹⁴, Alviano y col. en hojas de *Croton cajucara* Benth ($33,4 \mu\text{g/mL}$)¹⁵, De Almeida y col. en las hojas de *Croton campestris* obtuvieron CMI $128 \mu\text{g/mL}$ ¹³, Andrade y col. en los tallos con hojas de *Croton zehntneri* ($145,0 \mu\text{g/mL}$)¹⁸, Araújo y col. en las partes aéreas de *Croton heliotropiifolius* Kunth ($500 \mu\text{g/mL}$)¹⁰⁵, Leite y col. en las hojas de *Croton limae* ($512 \mu\text{g/mL}$)¹⁰⁷ y Lawal y col. en las hojas de *Croton gratissimus* ($600 \mu\text{g/mL}$)¹⁰⁴. Resultados similares se obtuvieron en el presente estudio para las hojas de *Croton thurifer* Kunth ($291 \mu\text{g/mL}$). Por otro lado otros autores reportaron que los aceites esenciales de las siguientes especies vegetales no tuvieron buena actividad Fatiany y col. en las hojas de *Croton boraum* ($1,25 \mu\text{L/mL}$ / $1151 \mu\text{g/mL}$)²⁶, *Croton greveanus* ($1,25 \mu\text{L/mL}$ / $1126 \mu\text{g/mL}$)²⁶ y *Croton geayi* ($2,5 \mu\text{L/mL}$ / $2260 \mu\text{g/mL}$)²⁶.

Bacillus subtilis, presentó buena actividad en los siguientes trabajos Yagi y col. en los tallos con hojas de *Croton zambesicus* ($16 \mu\text{g/mL}$)¹⁴, Araújo y col. en las partes aéreas de *Croton heliotropiifolius* Kunth ($62,5 \mu\text{g/mL}$)¹⁰⁵, Andrade y col. en los tallos con hojas de *Croton zehntneri* ($58,75 \mu\text{g/mL}$)¹⁸ y Fatiany y col. en las hojas de *Croton boraum* ($0,312 \mu\text{L/mL}$ / $287 \mu\text{g/mL}$)²⁶. Resultados similares se obtuvieron para los aceites de las hojas de las tres especies estudiadas, obteniéndose mejores resultados para *Croton collinus* Kunth ($73 \mu\text{g/mL}$), seguido de *Croton thurifer* Kunth ($150 \mu\text{g/mL}$) y *Croton adipatus* Kunth ($281 \mu\text{g/mL}$). Por otro lado Fatiany y col. en las hojas de *Croton greveanus* ($1,25 \mu\text{L/mL}$ / $1126 \mu\text{g/mL}$)²⁶ y *Croton geayi* ($5 \mu\text{L/mL}$ / $4520 \mu\text{g/mL}$)²⁶ reportaron que estas especies vegetales no presentaban actividad.

Para ***Escherichia coli***, los siguientes autores reportaron actividad Yagi y col. en los tallos con hojas de *Croton zambesicus* (16 µg/mL)¹⁴ y De Heluani y col. en las raíces de *Croton hieronymi* Griseb a una concentración de (100 µg/mL)²². Por otra parte Leite y col. en las hojas de *Croton limae* (≥1024 µg/mL)¹⁰⁷, Fatiany y col. en las hojas de *Croton boraïum* (1,25 µL/mL / 1151 µg/mL)²⁶, *Croton greveanus* (5 µL/mL / 4505 µg/mL)²⁶ y Lawal y col. en las hojas de *Croton gratissimus* (1300 µg/mL)¹⁰⁴. Del mismo modo en el presente estudio no se encontró actividad de *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth.

Pseudomonas aeruginosa, Yagi y col. en los tallos con hojas de *Croton zambesicus* (250 µg/mL)¹⁴ reportaron actividad significativa. Mientras tanto Leite y col. en las hojas de *Croton limae* (1024 µg/mL)¹⁰⁷, Fatiany y col. en las hojas de *Croton boraïum* (1,25 µL/mL / 1151 µg/mL)²⁶, *Croton greveanus* (5 µL/mL / 4505 µg/mL)²⁶ y Lawal y col. en las hojas de *Croton gratissimus* (5000 µg/mL)¹⁰⁴, no evidenciaron resultados prometedores, así como las especies del presente estudio.

Para ***Candida albicans***, se reportaron buena actividad según Alviano y col. en hojas de *Croton cajucara* Benth (13,4 µg/mL)¹⁵, Andrade y col. en los tallos con hojas de *Croton zehntneri* (58,75 µg/mL)¹⁸ y De Heluani y col. en las raíces de *Croton hieronymi* Griseb (100 µg/mL). Resultados similares se presentaron en el presente estudio para las especies de *Croton adipatus* Kunth (571 µg/mL) y *Croton collinus* Kunth (574 µg/mL). Por otra parte De Heluani y col. en las hojas de *Croton hieronymi* Griseb (>1000 µg/mL)²² no presentó actividad, del mismo modo se observó para la especie *Croton thurifer* Kunth (1171 µg/mL).

Como se evidencia en el presente estudio las especies *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth, presentaron mayor actividad según la prueba de microdilución contra las Gram positivas y la levadura. Otros estudios de las especies *Croton* revelaron actividad diversa sobre los microorganismos en estudio, lo cual significa la alta variabilidad de los componentes presentes y asociados a esta actividad. Diversos autores mencionan ligera sensibilidad de las

Gram positivas respecto a las Gram negativas. El motivo principal es la presencia de la membrana extracelular en las Gram negativas, la cual regula el paso de los componentes hidrofóbicos y de este modo evita la alteración de la permeabilidad de la membrana. Así mismo diversos estudios atribuyen la actividad antimicrobiana a los siguientes componentes: terpinen-4-ol⁶, α -terpineno⁷, 1,8-cineol¹⁰⁸, δ -cadineno¹⁰⁸, β -cariofileno¹⁰⁸, β -elemeno¹⁰⁸, germacreno¹⁰⁸, p-cimeno¹⁰⁸, γ -terpineno¹⁰⁸, mirceno¹⁰⁸, α -pineno¹⁰⁹, β -pinene¹⁰⁹, linalool¹¹⁰, α -felandreno¹¹¹, β -felandreno^{111,112}, sabineno¹¹², entre otros. Estos componentes fueron encontrados en los aceites esenciales del presente estudio. Además la actividad observada también podría ser explicada por la presencia de los componentes en mayor proporción o a la acción sinérgica entre ellos^{7,113-115}.

Respecto a la determinación de la **actividad antioxidante** mediante el método DPPH, el aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth presentó IC₅₀ de 9,16 mg/mL (ver Tabla 26), mientras que el *Croton thurifer* Kunth fue 9,42 mg/mL (ver Tabla 27) y el *Croton collinus* Kunth fue 11,51 mg/mL (ver Tabla 28). Otros autores también reportaron actividad antioxidante para otras especies del género *Croton*: Simionatto y col. en la corteza de *Croton urucurana* Baillon (1,05 mg/mL)¹¹⁶, Yagi y col. en las partes aéreas de *Croton zambesicus* (4,2 mg/mL)¹⁴, Rossi y col. en la corteza de *Croton lechleri* Müll. Arg. (15,28 mg/mL)¹¹⁷, Donati y col. en las hojas (36,38 mg/mL) y en los tallos (27,4 mg/mL)¹⁶ y Da Silva Brito y col. en las hojas de *Croton heliotropiifolius* Kunth (34,8 mg/mL), *Croton argyrophyllus* Kunth (46,3 mg/mL)¹¹⁸. En general los resultados obtenidos de las tres especies estudiadas no presentaron actividad antioxidante por el método empleado. Mayormente se atribuye la capacidad antioxidante de los aceites esenciales a la presencia de compuestos fenólicos o a la presencia de ciertos componentes terpénicos (α -terpineno, γ -terpineno, terpinoleno, β -cariofileno, γ -terpineno, p-cimeno, linalool). De las tres especies estudiadas ninguna presentó compuestos fenólicos, y las especies que mostraron los compuestos terpénicos mencionados anteriormente, sólo se cuantificaron en pequeñas concentraciones. Debido a lo cual, se podría explicar la baja actividad de los aceites en estudio. Los resultados del presente estudio son los primeros reportados¹¹⁹⁻¹²³.

VI. CONCLUSIONES

1. Se determinó que los componentes químicos mayoritarios del aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth fueron β -mirceno (18,34%), α -thuyeno (12,69%), D-limoneno (10,94%), α -felandreno (8,19%) y β -elemeno (6,47%); para *Croton thurifer* Kunth los componentes desconocidos ($C_{10}H_{16}$; t_R : 18,57; 22,38%), ($C_{15}H_{26}O$; t_R : 53,7; 21,8%), β -elemeno (11,87%) y germacreno D (10,22%); y para *Croton collinus* Kunth β -cariofileno (44,7%), D-limoneno (8,73%), β -thuyeno (6,96%), β -mirceno (6,79%) y β -elemeno (6,7%).
2. El aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth presentó actividad antimicrobiana moderada frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ($0,31 \pm 0$ μ L/mL / 281 μ g/mL) y actividad débil frente a *Candida albicans* ATCC 10231 ($0,63 \pm 0$ μ L/mL / 571 μ g/mL); *Croton thurifer* Kunth actividad moderada frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ($0,31 \pm 0$ μ L/mL / 291 μ g/mL) y *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ($0,16 \pm 0$ μ L/mL / 150 μ g/mL); y *Croton collinus* Kunth buena actividad frente a *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ($0,08 \pm 0$ μ L/mL / 73 μ g/mL) y débil actividad frente a *Candida albicans* ATCC 10231 ($1,25 \pm 0$ μ L/mL / 574 μ g/mL).
3. Los aceites esenciales de *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth, no presentaron actividad antioxidante para el método DPPH.

VII. RECOMENDACIONES

- Continuar el trabajo de investigación de los aceites esenciales de *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth para determinar otras propiedades biológicas.
- Continuar la investigación de los aceites esenciales de *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth frente a otras cepas de interés alimenticio, clínico e industrial.
- Determinar la toxicidad de los aceites esenciales de *Croton adipatus* Kunth, *Croton thurifer* Kunth y *Croton collinus* Kunth.
- Elucidar los componentes mayoritarios desconocidos de la especie *Croton thurifer* Kunth.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS. Medicina tradicional: definiciones [Internet]. Who.int. 2017 [cited 3 February 2017]. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
2. Puelles M, Gómez V, Gabriel J, Moris G. Las Plantas Medicinales de Perú Etnobotánica y viabilidad comercial. 1ª ed. Madrid: Los libros de la Catarata; 2010.
3. León B, Riina R, Berry P. Euphorbiaceae endémicas del Perú. Rev Peru Biol. 2006; 13(2):295-301.
4. Coy A, Gómez D, Castiblanco F. Importancia medicinal del género *Croton* (Euphorbiaceae). Rev Cubana Plant Med. 2016; 21(2):234-247.
5. Hwang A, Gums J. The emergence and evolution of antimicrobial resistance: Impact on a global scale. Bioorg Med Chem. 2016; 24(24):6440-6445.
6. Raut J, Karuppayil S. A status review on the medicinal properties of essential oils. Ind Crops Prod. 2014; 62:250-264.
7. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—A review. Int J Food Microbiol. 2004; 94(3):223-253.
8. Adorjan B, Buchbauer G. Biological properties of essential oils: an updated review. Flavour Fragr J. 2010; 25(6):407-426.
9. Edris A. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. Phytother Res. 2007; 21(4):308-323.
10. Lang G, Buchbauer G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. Flavour Fragr J. 2011; 27(1):13-39.
11. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. Food Chem Toxicol. 2008; 46(2):446-475.

12. Peres M, Monache F, Cruz A, Pizzolatti M, Yunes R. Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). J Ethnopharmacol. 1997; 56(3):223-226.
13. De Almeida T, Rocha J, Rodrigues F, Campos A, da Costa J. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. Ind Crops Prod. 2013; 44:630-633.
14. Yagi S, Babiker R, Tzanova T, Schohn H. Chemical composition, antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from aromatic plants growing in Sudan. Asian Pac J Trop Med. 2016; 9(8):763-770.
15. Alviano W, Mendonca-Filho R, Alviano D, Bizzo H, Souto-Padron T, Rodrigues M et al. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20(2):101-105.
16. Donati M, Mondin A, Chen Z, Miranda F, do Nascimento B, Schirato G et al. Radical scavenging and antimicrobial activities of *Croton zehntneri*, *Pterodon emarginatus* and *Schinopsis brasiliensis* essential oils and their major constituents: estragole, trans-anethole, β -caryophyllene and myrcene. Nat Prod Res. 2014; 29(10):939-946.
17. Voukeng I, Beng V, Kuete V. Antibacterial activity of six medicinal Cameroonian plants against Gram-positive and Gram-negative multidrug resistant phenotypes. BMC Complement Altern Med. 2016; 16(1):388.
18. Andrade T, de Lima S, Freitas R, Rocha M, Islam T, Silva T et al. Isolation, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activity of estragole, obtained from the essential oil of *Croton zehntneri* (Euphorbiaceae). An Acad Bras Cienc. 2015; 87(1):173-182.
19. Melo G, Costa A, Garino Junior F, Medeiros R, Madruga M, Queiroga Neto V. The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to *Croton blanchetianus* Baill essential oil. Braz J Microbiol. 2013; 44(4):1189-1194.
20. Moreno P, Lima M, Caruzo M, Torres D, Cordeiro I, Young M. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Croton heterocalyx* Baill. (Euphorbiaceae s.s.) Leaves. J Essent Oil Res. 2009; 21(2):190-192.

21. Vidal C, Oliveira-Tintino C, Tintino S, Galvão H, Costa J, Coutinho H et al. Chemical composition, antibacterial and modulatory action of the essential oil of *Croton rhamnifolioides* leaves Pax and Hoffman. Biosci J. 2016; 32(6):1632-1643.
22. De Heluani C, de Lampasona M, Vega M, Catalan C. Antimicrobial activity and chemical composition of the leaf and root oils from *Croton hieronymi* Griseb. J Essent Oil Res. 2005; 17(3):351-353.
23. Athikomkulchai S, Tadtong S, Ruangrunsi N, Hongratanaworakit T. Chemical composition of the essential oil from *Croton oblongifolius* and its antibacterial activity against *Propionibacterium acnes*. Nat Prod Commun. 2015; 10(8):1459-1460.
24. Azevedo M, Chaves F, Almeida C, Bizzo H, Duarte R, Campos-Takaki G et al. Antioxidant and antimicrobial activities of 7-Hydroxy-calamenene-rich essential oils from *Croton cajucara* Benth. Molecules. 2013; 18(1):1128-1137.
25. Peixoto R, Guilhon G, das Graças B, Zoghbi M, Araújo I, Uetanabaro A, Santos L et al. Volatiles, a glutarimide alkaloid and antimicrobial effects of *Croton pullei* (Euphorbiaceae). Molecules. 2013; 18(3):3195-3205.
26. Fatiany P, Robijaona B, Soavina S, Randrianirina Y, Abdallah M, Fienena F et al. GC-FID and GC/MS analyses and antimicrobial activity of *Croton greveanus*, *C. borarium* and *C. geayi* (Euphorbiaceae) essential oils from Madagascar. J Pharmacogn Phytochem. 2016; 5(6):188-197.
27. Fuertes C, Benavides A, Pizza C, Napolitano A, Basarello C, Piacente S, Carbone V. Estudio químico analítico de la fracción alcaloídica del extracto metanólico de las hojas de *Croton baillonianus* (AUBL). Bol Soc Quim Peru. 2012; 78(2):138-143.
28. Tamariz J, Capcha R, Palomino E, Aguilar J. Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (*Croton lechleri*) frente al *Helicobacter pylori*. Rev Medica Hered. 2003; 14(2):81-88.
29. Inostroza L, Castro A, Hernández E, Casanova H. Evaluación de la actividad leishmanicida y toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de los tallos de *Croton alnifolius*. Cienc Investig. 2011; 14(2):15-21.
30. Sandoval M, Ayala S, Oré R, Loli A, Huamán O, Valdivieso R, Béjar E. Capacidad antioxidante de la sangre de grado (*Croton palanostigma*)

- sobre la mucosa gástrica, en animales de experimentación. An Fac Med. 2006; 67(3):199-205.
31. Macbride F. Flora of Peru. Publ. Field Mus., Bot. Ser. 1951. 13(3A/1): 3-288.
 32. Steinmann V. Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. Acta Bot Mex. 2002; 61:61-93.
 33. Zegarra R. Las especies de la familia Euphorbiaceae en la provincia de Tacna: estudio biosistemático. Rev Cienc Desarro. 2015; 19:44-48.
 34. Murillo J. Composición y distribución del género *Croton* (Euphorbiaceae) en Colombia, con cuatro especies nuevas. Caldasia. 1999; 21(2):141-166.
 35. Luján M, León Y, Riina R. Sinopsis de *Croton* (Euphorbiaceae) en los Andes de Mérida, Venezuela. Caldasia. 2015; 37(1):73-90.
 36. Nath R, Roy S, De B, Choudhury MD. Anticancer and antioxidant activity of *Croton*: a review. Int J Pharm Pharm Sci. 2013; 5(2):63-70.
 37. Tropicos | Name - *Croton adipatus* Kunth [Internet]. Tropicos.org. [cited 17 February 2018]. Disponible en: <http://tropicos.org/Name/12800793>.
 38. Macbride J. Euphorbiaceae. Publ. Field Mus. Nat. Hist., Bot. Ser. 1951. 13(3A/1): 3–200.
 39. Tropicos | Name - *Croton adipatus* Kunth [Internet]. Tropicos.org. [cited 17 February 2018]. Disponible en: <http://tropicos.org/Name/12800793?tab=specimens>
 40. Blanca L, Ricarda R, Paul B. Euphorbiaceae endémicas del Perú. Rev Peru Biol. 2006; 13(2):295-301.
 41. Marcelo Peña J, Pennington R, Reynel C, Zevallos P. Guía ilustrada de la flora leñosa de los bosques estacionalmente secos de Jaén, Perú. 1st ed. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2010.
 42. Tropicos | Name - *Croton thurifer* Kunth [Internet]. Tropicos.org. [cited 16 February 2018]. Disponible en: <http://tropicos.org/Name/12801150>
 43. Tropicos | Specimen - Angel Díaz - s.n. [Internet]. Tropicos.org. [cited 16 February 2018]. Disponible en: <http://tropicos.org/Specimen/2940277>

44. Tropicos | Specimen - Jennifer Gruhn - 239 [Internet]. Tropicos.org. [cited 16 February 2018]. Disponible en: <http://tropicos.org/Specimen/100210209>
45. Tropicos | Specimen - Walter A. Palacios - 3339 [Internet]. Tropicos.org. [cited 16 February 2018]. Disponible en: <http://tropicos.org/Specimen/141404>
46. Tropicos | Name - *Croton thurifer* Kunth [Internet]. Tropicos.org. [cited 15 February 2018]. Disponible en: <http://tropicos.org/Name/12801150?tab=specimens>
47. Tropicos | Name - *Croton collinus* Kunth [Internet]. Tropicos.org. [cited 17 February 2018]. Disponible en: <http://tropicos.org/Name/12802340?tab=synonyms>
48. Tropicos | Specimen - Irene Shonle - 17 [Internet]. Tropicos.org. [cited 17 February 2018]. Disponible en: <http://tropicos.org/Specimen/157143>
49. García F. Etnobotánica de cuatro comunidades del distrito de Huambos, Cajamarca. [Tesis para optar el título profesional de Biólogo] Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2017.
50. Başer K, Buchbauer G. Handbook of essential oils. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis; 2010.
51. Bruneton J, Villar del Fresno A, Carretero E, Rebuelta M. Farmacognosia. 2nd ed. Zaragoza: Acribia; 2001.
52. Da Porto C, Decorti D, Kikic I. Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. Food Chem. 2009; 112(4):1072-1078.
53. Peredo H, Palou E, López A. Aceites esenciales: métodos de extracción. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos. 2009; 3(1):24-32.
54. Gaspar F. Extraction of essential oils and cuticular waxes with compressed CO₂: Effect of extraction pressure and temperature. Ind Eng Chem Res. 2002; 41(10):2497-2503.
55. Do T, Hadji-Minaglou F, Antonioti S, Fernandez X. Authenticity of essential oils. Trends Analyt Chem. 2015; 66:146-157.

56. Jalali-Heravi M, Parastar H. Recent trends in application of multivariate curve resolution approaches for improving gas chromatography–mass spectrometry analysis of essential oils. *Talanta*. 2011; 85(2):835-849.
57. Llana-Ruiz-Cabello M, Pichardo S, Maisanaba S, Puerto M, Prieto A, Gutiérrez-Praena D et al. In vitro toxicological evaluation of essential oils and their main compounds used in active food packaging: A review. *Food Chem Toxicol*. 2015; 81:9-27.
58. Pavela R. Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: A review. *Ind Crops Prod*. 2015; 76:174-187.
59. Patel S, Gogna P. Tapping botanicals for essential oils: Progress and hurdles in cancer mitigation. *Ind Crops Prod*. 2015; 76:1148-1163.
60. Skoog D, Holler F, Crouch S, Skoog D. Principios de análisis instrumental. 6e. México, México: Cengage Learning Editores S.A. de C.V.; 2008.
61. Pérez P. *Salvia Lavandulaefolia* Vahl spp. Oxyodon: Evaluación de su aceite esencial e incidencia en el medio ambiente según intensidades de recolección. [Tesis para optar el grado de doctor] Granada: Universidad de Granada; 2005.
62. Rojas R, Bustamante B, Bauer J, Fernández I, Albán J, Lock O. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. *J Ethnopharmacol*. 2003; 88(2-3):199-204.
63. Biemer J. Antimicrobial susceptibility testing by the Kirby-Bauer disc diffusion method. *Ann Clin Lab Sci*. 1973; 3(2):135-140.
64. Jorgensen J, Ferraro M. Antimicrobial Susceptibility Testing: A review of general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis*. 2009; 49(11):1749-1755.
65. Clinical Laboratory Standards Institute. M100S Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 26th Ed. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2016.
66. Clinical Laboratory Standards Institute. M27-A2 Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard NCCLS; 2nd Ed. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2002.

67. Tsouh PV, Kissi A, Yeboah D, Appiah R, Addo P, Tchokouaha L, et al. In vitro activity of selected West African medicinal plants against *Mycobacterium ulcerans* disease. *Molecules*. 2016; 21(445):1-13.
68. Clinical Laboratory Standards Institute. M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; 10th Ed. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards; 2015.
69. Liu M, Seidel V, Katerere DR, Gray AI. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. *Methods*. 2007; 42(4):325-9.
70. Corrales L, Muñoz M. Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. *Nova*. 2012; 10(18):213-225.
71. Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepc)*. 2006; 2(494):161-172.
72. Coronado H M, Vega y León S, Gutiérrez T R, Vázquez F M, Radilla V C. Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Rev Chil Nutr*. 2015; 42(2):206-212.
73. Venereo J. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cub Med Mil*. 2002; 31(2):126-133.
74. Delgado L, Betanzos G, Sumaya T. Importancia de los antioxidantes dietarios en la disminución del estrés oxidativo. *Investig Cienc*. (50):10-15.
75. Alam M, Bristi N, Rafiquzzaman M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharm J*. 2012; 21(2):143-152.
76. Muñoz López de Bustamante F. Plantas medicinales y aromáticas. 1st ed. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 2002.
77. Costa A, Melo G, Madruga M, Costa J, Garino Junior F, Queiroga Neto V. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of a *Croton rhamnifolioides* leaves Pax & Hoffm. *Semin Cienc Agrar*. 2013; 34(6):2853-2864.
78. Castro A. Composición química del aceite esencial de las hojas de *Erythroxylum novogranatense* (Morris) "coca", actividad antioxidante y determinación antibacteriana frente a *Streptococcus mutans*. [Tesis para

optar el grado de doctor en Farmacia y Bioquímica] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2008.

79. The united states pharmacopeia and national formulary (USP 40-NF 35). 1st ed. Rockville, Md.: The United States Pharmacopeial Convention; 2016.
80. Ruiz J. Actividad antifúngica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales. [Tesis para optar e grado de magister en Microbiología] Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.
81. Wiegand I, Hilpert K, Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc.* 2008; 3(2):163-75
82. Favela J. Aislamiento y caracterización de los compuestos antibacterianos y antituberculosos *Larrea tridentata*, determinación de su toxicidad y mecanismo de acción del compuesto más activo. [Tesis para optar el grado de doctor en Ciencias] México: Universidad Autónoma de Nuevo León; 2012.
83. Holetz F, Pessini G, Sanches N, Cortez D, Nakamura C, Dias Filho B. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97(7):1027-1031.
84. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol.* 2004; 26(2):211-219
85. Kuskoski E, Asuero A, Troncoso A, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Cienc Tecnol Aliment.* 2005; 25(4):726-732.
86. Mendoza D, Benavides H, Taborda M. Actividad acaricida del aceite esencial de la corteza de *Cronton malambo* H. Karst, metil-eugenol y metil-isoeugenol contra *Dermaphagoides farinae* Hughes, 1961. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat.* 2014; 13(6): 537-544.
87. Figueiredo C, Barroso J, Pedro L, Scheffer C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr J.* 2008; 23:213-226.

88. Rivera J, Crandall P, O'Bryan C, Ricke S. Essential oils as antimicrobials in food systems – A review. *Food Control*. 2015; (44):111-119.
89. De Araújo I, da Camara C. Volatile constituents of two croton species from Caatinga biome of Pernambuco – Brasil. *Rec Nat Prod*. 2012; 6(2):161-165.
90. Dai D, Huong L, Thang T, Ogunwande A. Chemical constituents of essential oils of the leaves of three species of *croton* from Vietnam. *Chem Nat Compd*. 2014; 50(1):155-157.
91. Turiel N, Ribeiro A, Carvalho E, Domingos V, Lucas F, Carreira L et al. Essential oils composition of *croton* species from the Amazon. *Nat Prod Commun*. 2013; 8(10):1471-1472.
92. Vunda S, Sauter I, Cibulski S, Roehe P, Bordinon S, Rott M et al. Chemical composition and amoebicidal activity of *Croton pallidulus*, *Croton ericoides*, and *Croton isabelli* (Euphorbiaceae) essential oils. *Parasitol Res*. 2012; 111(3):961-966.
93. Rojas J, Buitrago A, Rojas L, Cárdenas J, Carmona J. Chemical composition of the essential oil of *Croton huberi* Steyerl. (Euphorbiaceae) collected from Tachira-Venezuela. *J Essent Oil Bear Plants*. 2013; 16(5):646-650.
94. Radulović N, Mananjarasoa E, Harinantenaina L, Yoshinori A. Essential oil composition of four *Croton* species from Madagascar and their chemotaxonomy. *Biochem Syst Ecol*. 2006; 34(8):648-653.
95. Jaramillo B, Duarte E, Jaimes L. Bioactividad del aceite esencial de *Croton trinitatis* Millsp Colombiano. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*. 2016; 15(4):249-257.
96. Pinto C, de Menezes J, Siqueira S, Melo D, Feitosa C, Santos H. Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* of essential oils from *Croton jacobinensis* Baill. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat*. 2016; 15(2):122-127.
97. Silva F, Wisniewski Junior A, Cechinel Filho V, Nunes D. Chemical composition of essential oil from the bark of *Croton cajucara* Benth. *Acta Sci Technol*. 2012; 34(3):325-329.

98. Pino J, Marbot R, Payo A, Herrera P, Martí M. Componentes volátiles de las hojas de especies en Cuba de *Croton*: *C. rosmarinoides* Millsp., *C. litoralis* Urb., *C. spiralis* Muell. Arg., *C. myricifolius* Griseb. y *C. micradenus* Urb. Rev Cub Quim. 2007; 19(1):50-51.
99. Compagnone R, Chavez K, Mateu E, Orsini G, Arvelo F, Suárez A. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Croton matourensis* and *Croton micans* from Venezuela. Rec Nat Prod. 2010; 4(2):101-108.
100. Silva C, Zago H, Júnior H, da Camara C, de Oliveira J, Barros R et al. Composition and insecticidal activity of the essential oil of *Croton grewoides* Baill. against Mexican Bean Weevil (*Zabrotes subfasciatus* Boheman). J Essent Oil Res. 2008; 20(2):179-182.
101. Dias I, da Câmara C, Nogueira P. Volatile constituents of the leaves of *Croton sellowii* Baill (Euphorbiaceae). J Essent Oil Res. 2006; 18(4):360-361.
102. Souza A, de Britto D, Soares dos Santos U, dos Passos Bispo L, Cristina Casanova Turatti I, Peoporine Lopes N et al. Influence of season, drying temperature and extraction time on the yield and chemical composition of 'marmeleiro' (*Croton sonderianus*) essential oil. J Essent Oil Res. 2016; 29(1):76-84.
103. Dourado R, Silveira E. Preliminary investigation on the volatile constituents of *Croton sonderianus* Muell. Arg.: habitat, plant part and harvest time variation. J Essent Oil Res. 2005; 17(1):36-40.
104. Lawal O, Ogunwande I, Osunsanmi F, Opoku A, Oyedeji A. *Croton gratissimus* leaf essential oil composition, antibacterial, antiplatelet aggregation, and cytotoxic activities. J Herbs Spices Med Plants. 2017; 23(1):77-87.
105. Araújo F, Dantas M, e Silva L, Aona L, Tavares I, de Souza-Neta L. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Croton heliotropiifolius* Kunth from Amargosa, Bahia, Brazil. Ind Crops Prod. 2017; 105:203-206.
106. Alencar Filho J, Araújo L, Oliveira A, Guimarães A, Pacheco A, Silva F et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Croton heliotropiifolius* in different seasons of the year. Rev Bras Farmacogn. 2017; 27(4):440-444.

107. Leite T, Silva M, Santos A, Coutinho H, Duarte A, Costa J. Antimicrobial, modulatory and chemical analysis of the oil of *Croton limae*. Pharm Biol. 2017; 55(1):2015-2019.
108. Hernández L, Rodríguez M, García D, Pino J. Actividad antidermatofítica in vitro de aceites esenciales. Rev Cubana Plant Med. 2003; 8(2).
109. Nanasombat S, Lohasupthawee P. Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against salmonellae and other enterobacteria. KMITL Sci Tech J. 2005; 5(3):527-538.
110. Lungu C, Spac A, Brebu M, Tuchilus C, Miron A. Composition, and antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of a full-grown *Pinus cembra* L. tree from the Calimani Mountains (Romania). J Serb Chem Soc. 2013; 78(1):27–37.
111. Buitragoa D, Velasco J , Díaz T, Morales A. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Monticalia Imbricatifolia* Schultz (Asteraceae). Rev Latinoamer Quím. 2012; 40(1):13-18.
112. Mneimne M, Baydoun S, Nemer N, Apostolides N. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils Isolated from Aerial Parts of *Prangos asperula* Boiss. (Apiaceae) Growing Wild in Lebanon. Med Aromat Plants. 2016; 5(3):1-5.
113. Lambert R, Skandamis P, Coote P, Nychas G. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. J Appl Microbiol. 2001; 91(3):453-462.
114. Vaara M. Agents that increase the permeability of the outer membrane. Microbiol Rev. 1992; 56(3): 395 – 411.
115. Wilkinson J, Hipwell M, Ryan T, Cavanagh H. Bioactivity of *Backhousia citriodora*: Antibacterial and Antifungal Activity. J Agric Food Chem. 2003; 51(1):76-81.
116. Simionatto E, Bonani V, Morel A, Poppi N, Raposo Júnior J, Stuker C et al. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. J Braz Chem Soc. 2007; 18(5):879-885.
117. Rossi D, Guerrini A, Maietti S, Bruni R, Paganetto G, Poli F et al. Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll.

- Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? Food Chem. 2011; 126(3):837-848.
118. Da Silva Brito S, Silva F, Malheiro R, Baptista P, Pereira J. *Croton argyrophyllus* Kunth and *Croton heliotropiifolius* Kunth: Phytochemical characterization and bioactive properties. Ind Crops Prod. 2018; 113:308-315.
 119. Emami S, Fakhrjafary M, Tafaghodi M, Hassanzadeh M. Chemical Composition and Antioxidant Activities of the Essential Oils of Different Parts of *Cupressus arizonica* Greene. J Essent Oil Res. 2010; 22(3):193-199.
 120. Graßmann J. Terpenoids as Plant Antioxidants. Vitam Horm. 2005; 72:505-535.
 121. Wang W, Wu N, Zu Y, Fu Y. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. Food Chem. 2008; 108(3):1019-1022.
 122. Wojtunik K, Ciesla L, Waksmundzka-Hajnos M. Model studies on the antioxidant activity of common terpenoid constituents of essential oils by means of the 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl method. J Agric Food Chem. 2014; 62(37):9088-9094.
 123. Farzaneh M, Kiani H, Sharifi R, Reisi M, Hadian J. Chemical composition and antifungal effects of three species of *Satureja* (*S. hortensis*, *S. spicigera*, and *S. khuzistanica*) essential oils on the main pathogens of strawberry fruit. Postharvest Biol Technol. 2015; 109:145-151.

IX. ANEXOS

ANEXO N° 1



RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 031/ -2013-MINAGRI-DGFFS/DGEFFS

Lima, 25-SET. 2013

VISTA:

La solicitud, con fecha de registro 10 de septiembre de 2013, presentada por el señor José Ricardo Campos De La Cruz ante la Unidad de Gestión Documentaria de la Dirección General Forestal y de Fauna Silvestre del Ministerio de Agricultura y Riego, sobre la inscripción en el Registro de profesionales y personas jurídicas que prestan servicios en materia forestal y de fauna silvestre; y,

CONSIDERANDO:

Que, de acuerdo al Decreto Supremo 030-2008-AG el ex Instituto Nacional de Recursos Naturales - INRENA fue fusionado en el Ministerio de Agricultura y según el Decreto Supremo N° 031-2008-AG se aprobó el Reglamento de Organización y Funciones del mencionado Ministerio;

Que, el artículo 4° de la Ley N° 29376, precisa que las funciones del ex Instituto Nacional de Recursos Naturales - INRENA serán ejercidas por el Ministerio de Agricultura y los Gobiernos Regionales dentro del marco de sus competencias;

Que, el Procedimiento N° 19 del Texto Único de Procedimientos Administrativos del Ministerio de Agricultura, cuya modificación fue aprobada mediante Resolución Ministerial N° 212-2011-AG, publicada el 03 de junio de 2011, en el Diario Oficial "El Peruano", estipula los requisitos necesarios para la inscripción en el Registro de profesionales y personas jurídicas que prestan servicios en materia forestal y de fauna silvestre. Asimismo, señala que la Autoridad competente para resolver el presente procedimiento administrativo es la Dirección de Gestión Forestal y de Fauna Silvestre;



Que, el Informe Técnico N° 3235-2013-AG-DGFFS-DGEFFS, de fecha 20 de septiembre de 2013, emitido por la Dirección de Gestión Forestal y de Fauna Silvestre, concluye que: i) la solicitud presentada por el señor José Ricardo Campos De La Cruz cumple con la totalidad de requisitos establecidos para el trámite conforme al Procedimiento N° 19 del Texto Único de Procedimientos Administrativos-TUPA del Ministerio de Agricultura y Riego; ii) el solicitante acreditó su experiencia laboral en identificación taxonómica de especímenes y productos de flora silvestre. Asimismo, entre algunas de sus publicaciones en el registro especializado que desea acceder se tiene: Interpretación fitosociológica de la vegetación de las lomas del desierto peruano (2011); *Bomarea spissiflora* y *Bomarea longipes* (Alstroemeriaceae) dos nuevos registros para la flora peruana (2011); Patrones de distribución de las comunidades de cactáceas en las vertientes occidentales de los Andes Peruanos (2012); *Maxillaria jostii* Dodson (ORCHIDACEAE) Un nuevo registro para la flora peruana (2012); conforme se aprecia en el currículum vitae presentado para la inscripción en el registro solicitado;

Que, en tal sentido, el referido informe recomienda aprobar la inscripción del señor José Ricardo Campos De La Cruz, en el Registro de profesionales que realizan certificación de identificación taxonómica (taxónomos-sistemáticos) de especímenes y productos de flora silvestre; teniendo en cuenta lo solicitado, para lo cual deberá emitirse el acto administrativo correspondiente;

Que, finalmente el Informe señala que debe precisarse que en el caso de configurarse supuestos de inhabilitación para contratar con el Estado, la inscripción en el registro será suspendida; y,

De conformidad con el artículo 8° del Reglamento de la Ley Forestal y de Fauna Silvestre aprobado por el Decreto Supremo N° 014-2001-AG, la Ley N° 27444, Ley del Procedimiento Administrativo General, el Reglamento de Organización y Funciones del Ministerio de Agricultura, aprobado por el Decreto Supremo N° 031-2008-AG.

SE RESUELVE:

Artículo 1°.- Aprobar la inscripción del señor José Ricardo Campos De La Cruz, en el Registro de profesionales que realizan certificación de identificación taxonómica (taxónomos-sistemáticos) de especímenes y productos de flora silvestre, con el número 36.

Artículo 2°.- Precisar que la presente inscripción en el registro se suspenderá si se configuran supuestos de inhabilitación para contratar con el Estado, así como para el ejercicio de la actividad profesional ordenada por la Autoridad Forestal y de Fauna Silvestre, el Colegio Profesional correspondiente, el Poder Judicial u otra Autoridad Competente, así como de verificarse incompatibilidad para el ejercicio profesional.

Artículo 3°.- Notificar la presente resolución al señor José Ricardo Campos De La Cruz para los fines de ley.

Artículo 4°.- Transcribir la presente resolución a la Dirección de Información y Control Forestal y de Fauna Silvestre y a la Administración Técnica Forestal y de Fauna Silvestre Lima.



Regístrese y comuníquese,

[Firma]
Dg. Silvia Velásquez Silva
Directora de Gestión Forestal y de
Fauna Silvestre (e)

ANEXO N° 2

José Ricardo Campos de la Cruz
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Tel: 017512863 - RPM 963689079
e-mail: joramde@gmail.com



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

Certifica:

Que, los Bachilleres SAMMY WESLEY MENDOZA BEINGOLEA Y JUANA LIZ LESLIE CUCHO MEDRANO, egresados de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, han solicitado la identificación y certificación botánica de una planta procedente de bosque seco en el Dpto. Cajamarca. Prov. Jaén. Localidad El Almendral, donde es conocida con el nombre vulgar “**mosquera chica**”, la muestra fértil con flores y frutos ha sido identificada como ***Croton adipatus* Kunth**. Y según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnolopsida
SUBCLASE	: Rosidae
ORDEN	: Euphorbiales
FAMILIA	: Euphorbiaceae
GENERO	: <i>Croton</i>
ESPECIE	: <i>Croton adipatus</i> Kunth

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 15 de junio del 2017



Jr. Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07 / e-mail: joricampos@yahoo.es

ANEXO 3

José Ricardo Campos de la Cruz
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. Nº 3796
Tel: 017512863 - RPM 963689079
e-mail: joramde@gmail.com



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- Nº 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL Nº 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

Certifica:

Que, los Bachilleres SAMMY WESLEY MENDOZA BEINGOLEA Y JUANA LIZ LESLIE CUCHO MEDRANO, egresados de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos han solicitado la certificación botánica de una planta procedente de bosque seco en el Dpto. Cajamarca. Prov. Jaén. Localidad El Almendral, donde es conocida con el nombre vulgar de “**cullishina**”, la muestra fértil con flores y frutos ha sido identificada como ***Croton thurifer* Kunth**. Y según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnolopsida
SUBCLASE	: Rosidae
ORDEN	: Euphorbiales
FAMILIA	: Euphorbiaceae
GENERO	: <i>Croton</i>
ESPECIE	: <i>Croton thurifer</i> Kunth

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 15 de junio del 2017



Ricardo Campos
José R. Campos De La Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jr. Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07 / e-mail: joricampos@yahoo.es

ANEXO N° 4

José Ricardo Campos de la Cruz
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Tel: 017512863 - RPM 963689079
e-mail: joramde@gmail.com



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

Certifica:

Que, los Bachilleres SAMMY WESLEY MENDOZA BEINGOLEA Y JUANA LIZ LESLIE CUCHO MEDRANO, egresados de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, han solicitado la certificación botánica de una planta procedente de bosque seco en el Dpto. Amazonas. Prov. Utcubamba. Localidad Jahuanga, donde es conocida con el nombre vulgar de “mosquera”, la muestra fértil con flores y frutos ha sido identificada como *Croton collinus* Kunth. Y según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnolopsida
SUBCLASE	: Rosidae
ORDEN	: Euphorbiales
FAMILIA	: Euphorbiaceae
GENERO	: <i>Croton</i>
ESPECIE	: <i>Croton collinus</i> Kunth

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

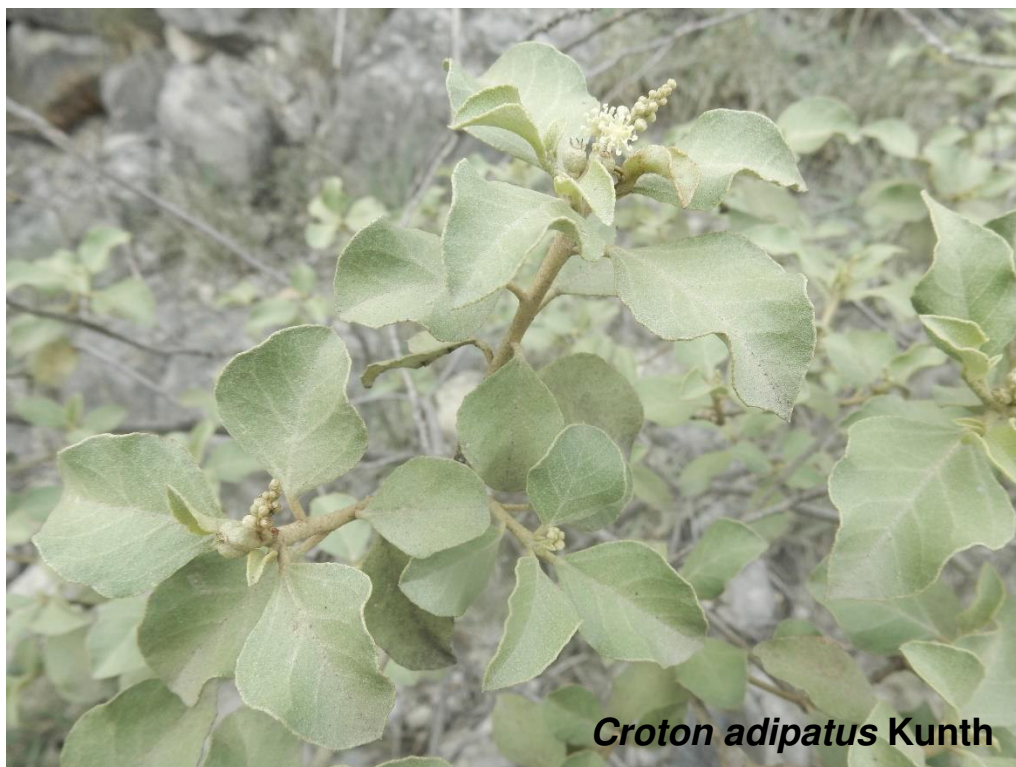
Lima, 15 de junio del 2017



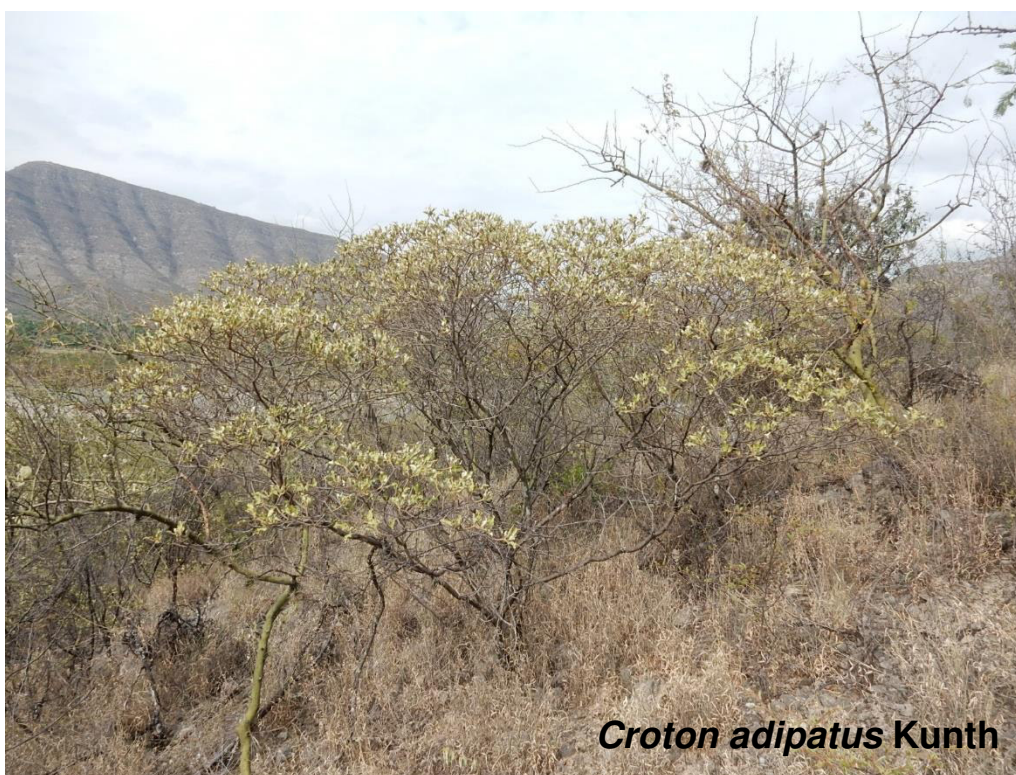
José R. Campos De La Cruz
José R. Campos De La Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jr. Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07 / e-mail: joricampos@yahoo.es

ANEXO N° 5



***Croton adipatus* Kunth**



***Croton adipatus* Kunth**

ANEXO N° 6



***Croton thurifer* Kunth**



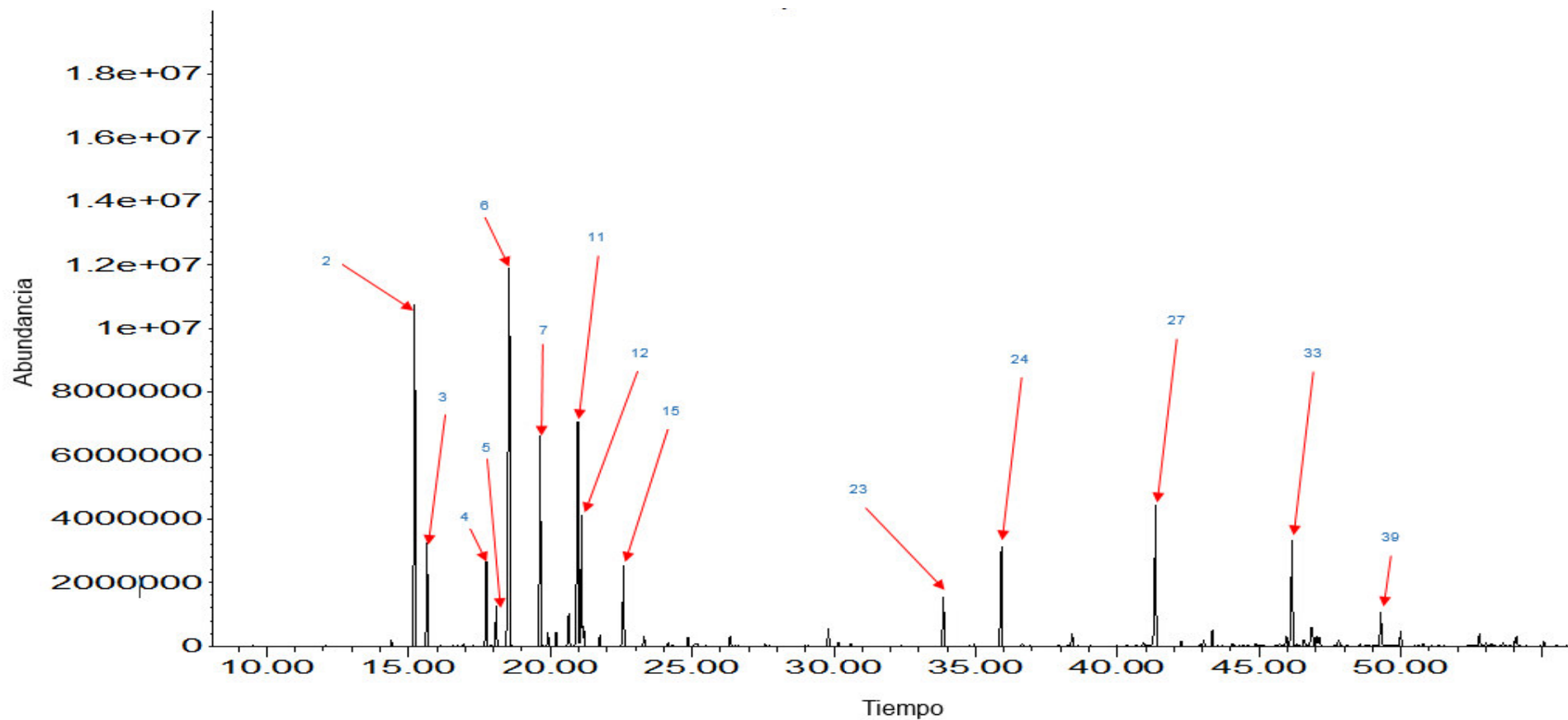
***Croton thurifer* Kunth**

ANEXO N° 7



ANEXO N° 8

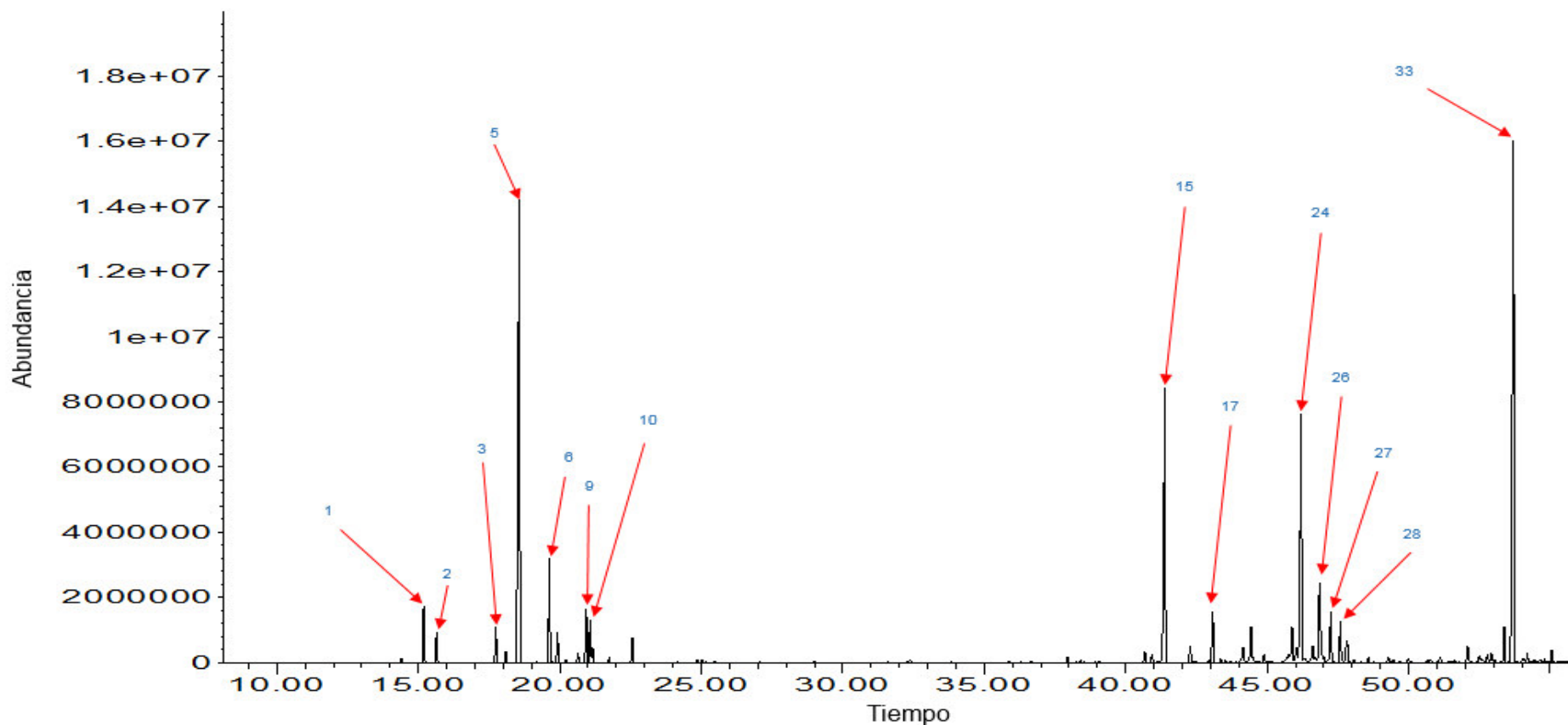
Cromatograma CG/EM del aceite esencial de *Croton adipatus* Kunth



Leyenda: 2 (α -thuyeno), 3 (1R- α -pineno), 4 (sabineno), 5 (β -pineno), 6 (β -mirceno), 7 (α -felandreno), 11 (D-limoneno), 12 (β -felandreno), 15 (τ -terpineno), 23 (2-undecanona), 24 (2-dodecanona), 27 (β -elemeno), 33 (germacreno D), 39 (elemol).

ANEXO N° 9

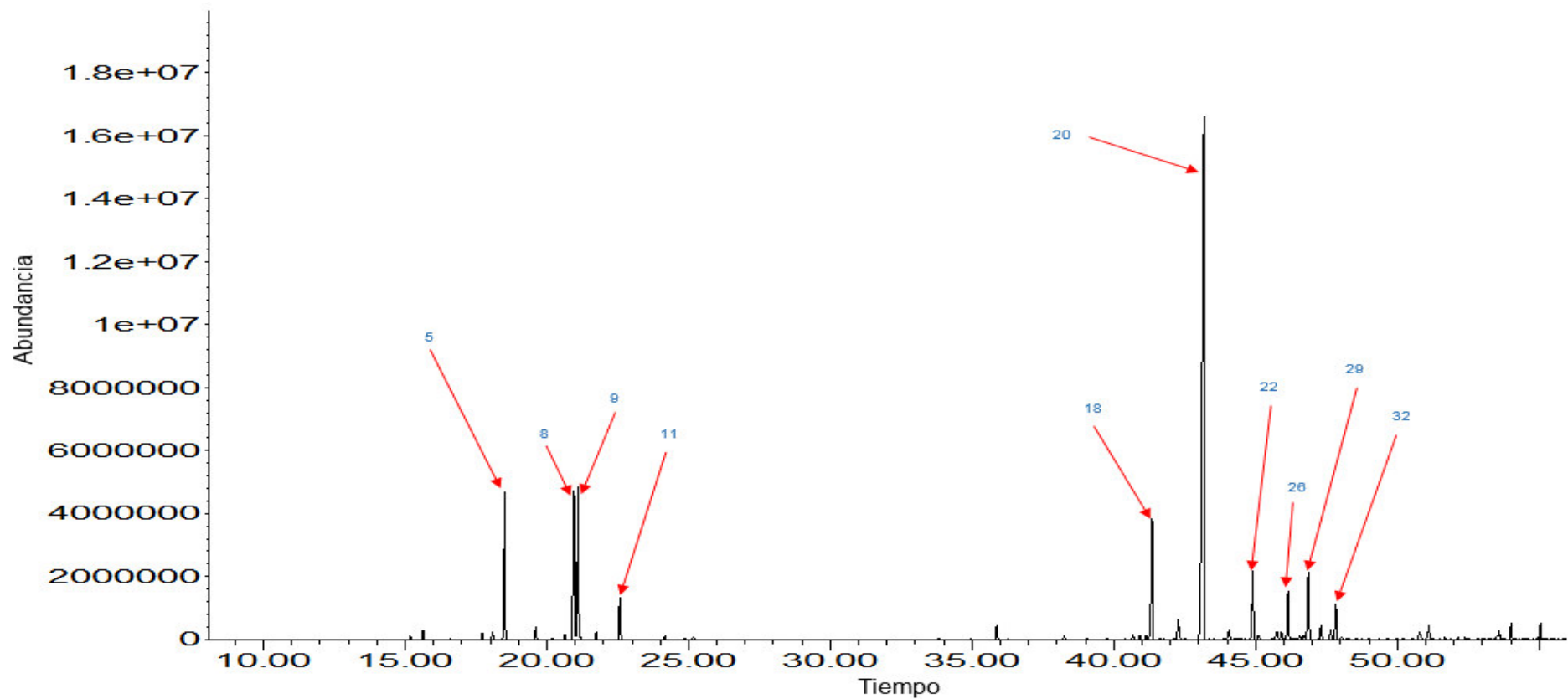
Cromatograma CG/EM del aceite esencial de *Croton thurifer* Kunth



Leyenda: 1 (α -thuyeno), 2 (α -pineno), 3 (sabineno), 5 (desconocido $C_{10}H_{16}$), 6 (α -felandreno), 9 (D-limoneno), 10 (β -felandreno), 15 (β -elemeno), 17 (β -cariofileno), 24 (germacreno D), 26 (desconocido $C_{15}H_{26}O$), 27 (eremofileno), 28 (desconocido $C_{15}H_{26}O$), 33 (desconocido $C_{15}H_{26}O$).

ANEXO N° 10

Cromatograma CG/EM del aceite esencial de *Croton collinus* Kunth



Leyenda: 5 (β -mirceno), 8 (D-limoneno), 9 (β -thuyeno), 11 [1-metil-4-(1-metiletil)-1,4-ciclohexadieno], 18 (β -elemeno), 20 (β -cariofileno), 22 (α -cariofileno), 26 (germacreno D), 29 (biciclogermacreno), 32 (δ -cadineno).